

**UNTERSUCHUNG VON MILCH, EIERN UND FLEISCH
AUF CHLORAMPHENICOL - RÜCKSTÄNDE:
VERGLEICH EINES RADIOIMMUNOASSAYS (RIA)
MIT EINEM ENZYMIMMUNOLOGISCHEN
VERFAHREN (ELISA)**

MICHAEL BECK

1987

Disbui. München

1988



Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Untersuchung von Milch, Eiern und Fleisch
auf Chloramphenicol-Rückstände:
Vergleich eines Radioimmunoassays (RIA) mit einem
enzymimmunologischen Verfahren (ELISA)

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Michael B e c k

aus

Wurmannsquick

München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. G. Giesecke

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
2 Schrifttum	2
2.1 Geschichte des Chloramphenicols (CAP)	2
2.2 Chemische und physikalische Eigenschaften	2
2.3 Biochemische Charakterisierung	7
2.4 Biologische Eigenschaften	8
2.4.1 Antibakterielle Wirkung	8
2.4.1.1 Wirkungstyp	8
2.4.1.2 Wirkungsspektrum	8
2.4.1.3 Wirkungsmechanismus	10
2.4.2 Resistenz	11
2.4.3 Therapeutische Anwendung	13
2.4.3.1 In der Humanmedizin	13
2.4.3.2 In der Veterinärmedizin	15
2.4.4 Pharmakokinetik	18
2.4.4.1 Resorption	18
2.4.4.2 Verteilung	19
2.4.4.3 Speicherung (Proteinbindung)	21
2.4.4.4 Metabolisierung (Biotransformation)	22
2.4.4.5 Elimination	26
2.5 Wechselwirkung mit anderen Wirkstoffen	29
2.6 Toxizität	30
2.6.1 Toxische Wirkung auf den Menschen	30
2.6.1.1 Frühtoxizität	31
2.6.1.2 Spätoxisität	31
2.6.1.3 Sonstige Nebenwirkungen	33
2.6.2 Toxische Wirkung auf Tiere	34
2.7 Beurteilung von CAP-Rückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs	36
2.8 Rechtsvorschriften	37

2.9	Nachweisverfahren	38
2.9.1	Mikrobiologische Verfahren	38
2.9.2	Kolorimetrie	40
2.9.3	Polarographie	40
2.9.4	Fluorometrie	41
2.9.5	Chromatographie	42
2.9.5.1	Papier- und Dünnschichtchromatographie	42
2.9.5.2	Gaschromatographie (GC)	43
2.9.5.3	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	45
2.9.6	Radioenzymatischer Nachweis	46
2.9.7	Immunologische Nachweisverfahren	47
2.9.7.1	Radioimmunologischer Nachweis (RIA)	48
2.9.7.2	Enzymimmunologischer Nachweis (EIA)	50
3	Eigene Untersuchungen	52
3.1	Geräte und Reagenzien	52
3.1.1	RIA	52
3.1.2	ELISA	55
3.1.3	Probenaufbereitung	56
3.1.4	Sonstige Laborgeräte und Hilfsmittel	57
3.1.5	Sonstige Chemikalien	57
3.2	Methodik	58
3.2.1	Radioimmunoassay (RIA)	58
3.2.2	Enzymimmunologischer Nachweis (ELISA)	63
3.2.3	Untersuchung von Milch mittels RIA und ELISA	66
3.2.3.1	Probenaufbereitung	66
3.2.3.2	Untersuchung von künstlich kontaminierter Milch	66
3.2.3.3	Untersuchung von natürlich kontaminierter Milch	67
3.2.4	Untersuchung von Hühnereiern mittels RIA und ELISA	67
3.2.4.1	Probenaufbereitung	67
3.2.4.2	Untersuchung von künstlich kontaminiertem Dotter und Vollei	68
3.2.4.3	Untersuchung von natürlich kontaminierten Hühnereiern (Dotter/Vollei)	68

3.2.5	Untersuchung von Fleisch mittels RIA und ELISA	69
3.2.5.1	Probenaufbereitung	69
3.2.5.2	Untersuchung von künstlich kontaminierten Muskel- und Nierenproben	69
3.2.5.3	Untersuchung von natürlich belasteten Muskel- und Nierenproben	70
3.3	Ergebnisse	72
3.3.1	Vergleich der Eichkurven von RIA und ELISA	72
3.3.2	Vergleichende Untersuchungen an Milch	72
3.3.2.1	Bestimmung der Wiederfindungsraten	72
3.3.2.2	Untersuchung von natürlich kontaminierter Milch	76
3.3.3	Vergleichende Untersuchungen an Hühnereiern	80
3.3.3.1	Bestimmung der Wiederfindungsraten in Dotter und Vollei	80
3.3.3.2	Bestimmung der CAP-Gehalte in natürlich kontami- nierten Hühnereiern	83
3.3.4	Vergleichende Untersuchungen an Fleisch	89
3.3.4.1	Bestimmung der Wiederfindungsraten	89
3.3.4.2	Bestimmung der CAP-Gehalte in natürlich kontami- niertem Fleisch	89
4	Diskussion	94
5	Zusammenfassung	104
6	Summary	106
7	Literatur	108

Abkürzungsverzeichnis

AB.A	Ausführungsbestimmungen A zum FlHG
BGA	Bundesgesundheitsamt
CAP	Chloramphenicol
CPM	counts per minute
DPM	disintegrations per minute
ECD	Elektroneneinfangdetektor
EIA	Enzyme-Immuno-Assay
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
FlHG	Fleischhygienegesetz
FlHV	Fleischhygiene-Verordnung
GC	Gaschromatographie
HPLC	High Pressure/Performance Liquid Chromatography
KGW	Körpergewicht
LMBG	Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
p. inj.	post injectionem
ppb	parts per billion ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
ppm	parts per million (mg/kg)
RIA	Radioimmunoassay
s.c.	subcutan

1 Einleitung

Chloramphenicol (CAP) ist ein Breitbandantibiotikum, das wegen seiner hervorragenden pharmakokinetischen und antibakteriellen Eigenschaften und auch aufgrund seines günstigen Preises in der zunehmend auf Rentabilität ausgerichteten Tierproduktion häufig eingesetzt wurde.

Hämatotoxische Nebenwirkungen auf den Menschen, vor allem aber die CAP-induzierte aplastische Anämie, für die bisher keine Dosis-Wirkungs-Beziehung abgeleitet werden konnte, veranlaßten die Administrative, den Einsatz dieses Arzneimittels für Tiere, die der Milchgewinnung und für Legehennen, die der Eigewinnung dienen, für letztere ab Beginn der Legereife, generell zu verbieten bzw. die erlaubten Höchstmengen für Milch und Eier auf 0,001 mg CAP pro kg (1 ppb) zu begrenzen. Bei Fleisch wurde die Höchstmenge auf 10 ppb festgesetzt. Für die Überwachung der betreffenden Lebensmittel sind daher hochempfindliche Nachweismethoden erforderlich, mit denen als Routineverfahren auch möglichst große Probenzahlen untersucht werden können.

Der von ARNOLD et al. (1984) am Bundesgesundheitsamt (BGA), Berlin entwickelte Radioimmunoassay (RIA) erfüllt diese Forderungen und wurde als amtliche Methode nach § 35 LMBG übernommen.

Da aber in vielen Instituten der Umgang mit radioaktiven Substanzen aus apparativen und sicherheitstechnischen Gründen nicht möglich ist, sind auch alternative Methoden erforderlich, um eine angemessene, rechtlich vorgesehene Überwachung der genannten Lebensmittel auf CAP-Rückstände sicherzustellen.

Erst kürzlich wurde ein am Institut erarbeiteter enzymimmunologischer Nachweis (ELISA) zur Bestimmung von CAP vorgestellt (MÄRTLBAUER u. TERPLAN, 1987), der diesem Anliegen gerecht würde. Ziel der eigenen Untersuchungen war, diesen ELISA bei der Untersuchung von künstlich und natürlich kontaminierten Lebensmitteln einzusetzen und seine Eignung im Vergleich zum RIA zu prüfen.

2 Schrifttum

2.1 Geschichte des Chloramphenicols (CAP)

1947 gelang Paul R. Burkholder die Isolierung einer antibiotisch wirkenden Substanz aus einem Actinomycetenstamm, der in einer Erdprobe aus Caracas, Venezuela, gefunden wurde und daraufhin den Namen *Streptomyces venezuelae* erhielt (EHRlich et al., 1947 u. 1948). Wegen der beiden Chloratome, die dieses Antibiotikum aufwies, wurde es "Chloromycetin" genannt (EHRlich et al., 1947; SMADEL u. JACKSON, 1947; BARTZ, 1948).

Etwa zur gleichen Zeit, aber völlig unabhängig davon, wurde an der Universität Illinois ein Breitbandantibiotikum aus einem anderen Streptomycetenstamm (*Streptomyces lavendulae*) isoliert und "Chloramphenicol" genannt (GOTTLIEB et al., 1948; EHRlich et al., 1948). Ein Vergleich beider Substanzen hinsichtlich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften zeigte, daß sie völlig identisch waren (GOTTLIEB et al., 1948).

Nachdem die chemische Struktur von CAP aufgeklärt werden konnte, gelang sehr rasch die chemische Synthese (REBSTOCK et al., 1949). Seit 1950 wird CAP als erstes, bis heute einziges therapeutisch bedeutungsvolles Antibiotikum ausschließlich vollsynthetisch hergestellt (WALTER u. HEILMEYER, 1975; FORTH et al., 1980).

2.2 Chemische und physikalische Eigenschaften

CAP ist chemisch einfach gebaut. Es bestehen strukturelle Gemeinsamkeiten zum Ephedrin. Beide besitzen ein Phenylpropylamin-Gerüst (FORTH et al., 1980).

Die systematische Bezeichnung für CAP lautet $\left[R-(R^*, R^*) \right]$ - 2,2-dichloro-N- $\left[2\text{-hydroxy } -1\text{- (hydroxymethyl) } -2\text{- (4-nitro-} \right.$

phenyl) ethyl] acetamide (Chemical Abstracts Nr. 56-75-7).
Ein Synonym ist D(-)-threo-1-(p-nitrophenyl)-2-(2,2-dichlor-
acetamido) -1,3- propandiol. Daraus ergibt sich folgende
Strukturformel (Abb. 1):

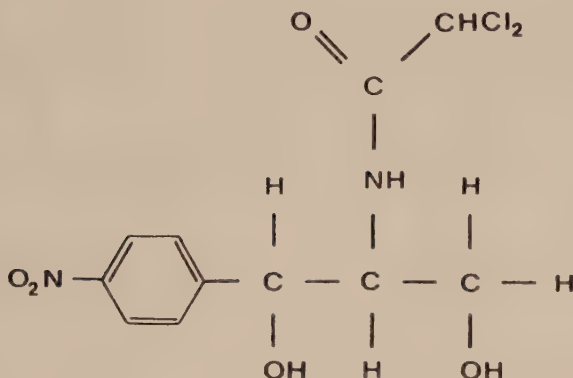


Abb. 1: Strukturformel von CAP

mit der Summenformel C₁₁H₁₂N₂O₅Cl₂. Das Molekulargewicht von 323,14 setzt sich zu 40,88% aus C, 3,74% aus H, 21,95% aus Cl, 8,67% aus N und 24,67% aus O zusammen (van der LEE, 1981).

Die dreidimensionale Darstellung von CAP wurde durch die Röntgenstrukturanalyse ermöglicht. Es zeigte sich, daß zwischen den beiden Hydroxylgruppen eine Wasserstoffbrückenbindung existiert, und sich dadurch die Propandiolseitenkette zu einem "alicyklischen" Ring schließt.

Der Dichloracetamidanteil faltet sich über den aromatischen Phenylring (DUNITZ, 1952; ACHARAYA u. GOWDA, 1979) (Abb. 2).



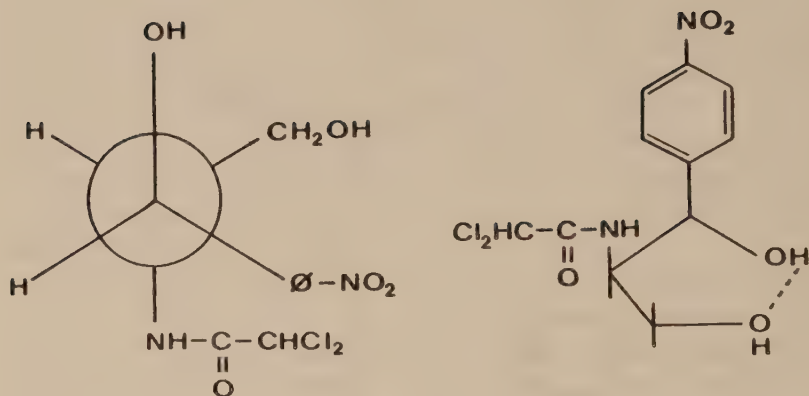


Abb. 2: Dreidimensionale Struktur von CAP (BOERTZ, 1984)

Das CAP-Molekül hat zwei Assymetriezentren und dementsprechend vier Stereoisomere (HAHN et al., 1956).

- D(-)-threo-Isomer
- L(+)-erythro-Isomer
- D(-)-erythro-Isomer
- L(+)-threo-Isomer

Nur die linksdrehende D(-)-threo-Verbindung, welche der natürlich vorkommenden Verbindung entspricht, besitzt gute antibakterielle Wirksamkeit (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

CAP ist ein feines, grauweißes bis gelblich-weißes kristallines Pulver mit bitterem Geschmack.

Sein Schmelzbereich liegt bei 149,7-150,7 °C (BARTZ, 1948).

CAP zählt zu den hitzestabilen Antibiotika (LUKASS, 1971). Der pH-Wert einer gesättigten wäßrigen Lösung liegt zwischen 5,5 und 7. CAP reagiert neutral (WALTER u. HEILMEYER, 1975). Vor Feuchtigkeit und Licht geschützt ist CAP als Pulver ca. 5 Jahre stabil und dadurch längere Zeit lagerfähig. In wäßriger Lösung verringert sich die Haltbarkeit auf

2 Jahre bei 5 °C

30 Tage bei 30 °C

5 Stunden bei 100 °C (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Der Aktivitätsverlust in wäßriger Lösung wird mit einem hydrolytischen Abbau erklärt. Durch Hydrolyse der Amidgruppe, die von einem pH-Wert zwischen 2 und 7 abhängig ist, wird Dichloressigsäure und 1-(4-nitrophenyl)-2-aminopropan-diol(1,3) (CAP-Base) gebildet (SHIH, 1971a; FALK u. ZENGEL, 1978).

CAP-Alkohol kann bei einem größeren pH-Wert als 7 durch Abspaltung des Carbonchloridrestes entstehen.

Arylamine und andere Abbauprodukte (z.B. p-Nitrobenzaldehyd) können sich durch sekundäre Reaktionen bilden (SHIH, 1971a). Großen Einfluß auf den Zersetzungsprozeß haben Pufferanionen; Phosphat-Ionen fördern die Zersetzung, Borat-Ionen hemmen sie und üben einen stabilisierenden Effekt aus (van der LEE, 1981).

Neben dem hydrolytischen Abbau wurden auch noch photochemische Reaktionen untersucht, bei denen unter anderem p-Nitrobenzoesäure, p-Nitrobenzaldehyd und 4,4-Azoxymethylenbenzoesäure als Abbauprodukte entstehen (SHIH, 1971b).

CAP ist optisch aktiv, die spezifische Drehung beträgt in Ethanol $[\alpha]^{25}_{D+19^\circ}$ und in Ethylacetat $[\alpha]^{25}_{D-25,5^\circ}$ (REBSTOCK et al., 1949).

Das Absorptionsmaximum in wäßriger Lösung liegt bei 278 nm (REBSTOCK et al., 1949; DEVANI et al., 1981). Das Infrarotspektrum zeigt durch die Amidbindung bedingt bei 1690 cm^{-1} , durch die Nitrogruppe bedingt bei 1530 cm^{-1} und bedingt durch die Hydroxylgruppe bei 1070 cm^{-1} charakteristische Banden (van der LEE, 1981).

Die Löslichkeit von CAP in den verschiedensten Lösungsmitteln wird in Tab. 1 dargestellt. Im Serum und im Harn ist CAP ähnlich löslich wie in Wasser (TROLLDENIER, 1977).

Tab. 1: Löslichkeit von CAP (WEISS et al., 1957)

Lösungsmittel	Löslichkeit von CAP in mg/ml (bei 28°C ± 4°C)
H ₂ O	4,4
Methanol	> 20
Ethanol	> 20
Isopropanol	> 20
Isoamylalkohol	17,3
Cyclohexan	0,13
Benzol	0,26
Toluol	0,145
Petroleumether	0,085
Isooctan	0,022
Carbontetrachlorid	0,295
Ethylacetat	> 20
Isoamylacetat	> 20
Aceton	> 20
Methylethylketon	> 20
Diethylether	> 20
Ethylenchlorid	2,3
1,4-Dioxan	> 20
Chloroform	1,95
Carbondisulfid	0,35
Pyridin	> 20
Formamid	> 20
Ethylenglykol	> 20
Benzylalkohol	14,6

2.3 Biochemische Charakterisierung

CAP ist die einzige natürlich vorkommende Substanz, die eine Nitrophenylgruppe besitzt (PILLOUD, 1982). Schon 1949 konnte geklärt werden, an welche chemische Strukturen die antibakterielle Wirkung von CAP gebunden ist (LONG u. TROUTMAN, 1949). Besondere Bedeutung kommt hier der aromatischen Ringstruktur und der para-Stellung der Nitrogruppe zu. Meta-CAP ist antibakteriell nicht wirksam. Die Nitrogruppe läßt sich durch Substituenten mit annähernd gleicher Elektronegativität ersetzen; vgl. Thiamphenicol (MANYAN et al., 1975). Von den vier möglichen Stereoisomeren ist nur das auch natürlich vorkommende D(-)-threo-Isomer biologisch aktiv (HAHN et al., 1956).

An der aliphatischen Seitenkette können die beiden Chloratome jeweils nur durch Brom (Bromamphenicol) ersetzt werden, ohne daß die Wirkung auf Bakterien beeinträchtigt wird (MANYAN et al., 1975).

Die Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 3 muß unverändert sein. Die geschmacksneutralen Ester wie CAP-Palmitat, -Succinat und -Cinnemat sind in dieser Form völlig inaktiv. Nach oraler Aufnahme werden sie im Duodenum durch Esterasen gespalten und zu originärem CAP zurückgebildet. Erst dann entfalten sie ihre volle Wirkkraft.

Bisher wurden über 500 Derivate synthetisiert, von denen aber keines dem originären CAP in seinen chemotherapeutischen Eigenschaften überlegen ist (HAHN, 1980).

2.4 Biologische Eigenschaften

2.4.1 Antibakterielle Wirkung

2.4.1.1 Wirkungstyp

In therapeutischen Konzentrationen wirkt CAP sowohl auf extrazellulär als auch auf intrazellulär im Organismus vorhandene Mikroorganismen vorwiegend bakteriostatisch. Die Wirkung auf im Proliferationsstadium befindliche Keime ist zuverlässiger, als auf solche im Ruhestadium (WALTER u. HEILMEYER, 1975; FORTH et al., 1980).

In vitro konnte gelegentlich eine schwache Bakterizidie beobachtet werden, die aber klinisch ohne Bedeutung bleibt.

2.4.1.2 Wirkungsspektrum

CAP gilt als Breitbandantibiotikum, dessen Wirkungsspektrum grampositive und gramnegative Keime umfaßt. Sein Wirkungsbereich ist weitgehend identisch mit dem der Tetracycline (FORTH et al., 1980).

In Tab. 2 werden alle CAP-empfindlichen Keime aufgelistet. Hervorzuheben ist die Wirkung von CAP auf Salmonellen, besonders *S. typhi* und *S. paratyphi*, die bisher von keinem anderen Antibiotikum übertroffen werden konnte (FORTH et al., 1980). Sie wird durch eine Anreicherung von CAP in Lymphe und Lymphknoten erklärt (NEUMAN u. MAUR, 1981).

Resistent und somit unempfindlich gegenüber CAP sind Mykobakterien, *Pseudomonas* und *Proteus*. Ebensowenig lassen sich Erkrankungen durch Viren, Pilze, Protozoen und einige Clostridien mit CAP beeinflussen (WALTER u. HEILMEYER, 1975; FORTH et al., 1980).

Tab. 2: Wirkungsspektrum von CAP (ROLLE u. Mayr, 1978; FORTH et al., 1980)

grampositive Erreger	gramnegative Erreger
Staphylokokken Streptokokken Enterokokken Pneumokokken Korynebakterien Listerien Erysipelothrix Bacillus anthracis Clostridien Aktinomyzeten Nokardien	E.coli Shigellen Salmonellen Klebsiella Enterobacter Meningokokken Gonokokken Brucellen Pasteurellen Vibrio cholerae Haemophilus Bordetella pertussis Actinobacillus mallei Bacteroides Fusobacterium fusiforme Bartonellen
Spirochäten Rickettsien Chlamydien (Bedsonien) Mykoplasmen	

2.4.1.3 Wirkungsmechanismus

Die bakteriostatische Wirkung von CAP resultiert aus einer Blockade der bakteriellen Proteinsynthese.

Die Peptidverknüpfung der einzelnen Aminosäuren in der Elongationsphase wird nicht mehr katalysiert. Dies geschieht durch selektive Hemmung der Peptidyltransferase, einem Strukturprotein der 50S-Untereinheiten der 70S-Ribosomen (WALTER u. HEILMEYER, 1975; FORTH et al., 1980).

In den Eukaryontenzellen (Säugetiere, Vögel, Pflanzen), in denen die zytoplasmatische Proteinsynthese an 80S-Ribosomen mit ihren 60S- und 40S-Untereinheiten erfolgt, kann hingegen die Elongationsphase ungehindert ablaufen.

Erst bei erheblicher Überdosierung (20-100fach) wird auch die ribosomale Proteinsynthese eukaryontischer Zellen gestört (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Ungünstigere Verhältnisse treffen für die Proteinsynthese in den Mitochondrien zu. Diese kann schon durch CAP in therapeutischen Dosen gestört werden, da mitochondriale Ribosomen in ihrem Verhalten den 70S-Bakterien-Ribosomen sehr ähnlich sind (HAPKE, 1979); (vgl. Toxizität).

2.4.2 Resistenz

Als resistent gegenüber einem Chemotherapeutikum bezeichnet man eine Bakterienart, wenn deren Vermehrung durch die therapeutisch erreichbare Konzentration (Blut- und Gewebespiegel) nicht gehemmt wird (PETZOLDT, 1977).

Man unterscheidet eine natürliche und eine erworbene Resistenz (FORTH et al., 1980).

Eine Erregerart, die über eine angeborene, d.h. genetisch fixierte, stets vorhandene Unempfindlichkeit gegenüber einem bestimmten Wirkstoff verfügt, also außerhalb des Wirkungsspektrums liegt, ist natürlich resistent. Übertragen auf CAP bedeutet das, daß z.B. Hefen, Pilze und Protozoen, deren Proteinsynthese an 80-S Ribosomen gebunden ist, physiologisch unempfindlich gegen CAP sind (VAZQUEZ, 1964; TROLLENIER, 1977).

Die erworbene Resistenz läßt sich nach ihren Entstehungsmöglichkeiten in chromosomale und extrachromosomale Resistenz unterteilen. Auf die allgemeinen, genetischen Mechanismen der Resistenzentstehung wird im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen.

Mikroorganismen können durch folgende Veränderungen resistent gegen ein Antibiotikum werden.

- Bildung von Enzymen, die das Antibiotikum durch chemische Umbildung inaktivieren können.
- Veränderung der Zellpermeabilität für das Antibiotikum.
- Erniedrigung der Bindungsaffinität an den Rezeptoren für das Antibiotikum.

Für CAP wurde inzwischen eine enzymatische Inaktivierung durch Acetylierung nachgewiesen (WALTER u. HEILMEYER, 1975). Resistente Mikroorganismen und Pilzsporen bilden spezifische Acetyltransferasen, welche CAP an ihrer primären und sekundären Alkoholgruppe angreifen (FORTH et al., 1980) und in Gegenwart von Acetyl-Coenzym A die Umwandlung zu inaktivem 3-Acetoxy- und 1,3-Diacetoxy-CAP bewirken (GAFFNEY u.

FOSTER, 1978). EL-KERSH und PLOURDE (1976) wiesen außerdem noch CAP-3-propionat, -3-isobutyrat und -3-butyrat als Umwandlungsprodukte nach.

Die acetylierten Derivate können nicht mehr an die Ribosomenuntereinheiten gebunden werden. Bisher wurden mindestens drei Typen von Acetyltransferasen identifiziert (GAFFNEY u. FOSTER, 1978).

Die durch Übertragung erworbene Resistenz ist im Vergleich zur Resistenz, die aus einer Mutation entstanden ist, weniger stabil. Durch unregelmäßige Replikation kann es ebenso zum Verlust von R-Faktoren und somit zum Verlust der Resistenzeigenschaften kommen (PILLOUD, 1982; ROLLE u. MAYR, 1978). Ein eindrucksvolles Beispiel für dieses Phänomen des Verlustes einer schon einmal vorhandenen Resistenz wurde 1972/73 anlässlich einer Typhusepidemie in Mexico beobachtet. Im Januar 1973 waren noch rund 80% aller Typhusstämmen CAP-resistent, ein Jahr später nur noch 10% (N.N., 1975).

Obwohl van UHLEN (1976) feststellte, daß bei Kälbern und Schweinen, die mit Gastroenteritis infiziert waren, 77,5% bzw. 36,1% aller Enterobakterien resistent gegen CAP sind, kann man die derzeitige Resistenzsituation für CAP als günstig bezeichnen.

Dieser Status sollte durch einen begrenzten, kurzzeitigen Einsatz bei strenger Indikationsstellung und entsprechender Dosierung gewahrt bleiben. Eine große Gefahr, die Resistenz zu provozieren, geht von einer übermäßigen Anwendung in der Veterinärmedizin aus. Die Verabreichung subtherapeutischer Dosen potenziert dieses Risiko. So führte z.B. bei Schweinen die Konzentration von 20 mg CAP pro kg Futter (20 ppm) im Laufe von wenigen Wochen zur Resistenz der gesamten coliformen Darmflora (BEYER et al., 1971).

Die Stellung von CAP als Reservemittel in der Humanmedizin, vor allem gegen Typhus und bakterielle Meningitis, kann dadurch stark beeinträchtigt werden. Eine CAP-Resistenz von

S. thyhi verursachte schon in einigen Ländern therapeutische Probleme, z.B. Mexiko 1972-1973 (LACEY, 1984) und Vietnam 1971-1974 (SHALIT u. MARKS, 1984). Desweiteren kann sich die Ausbildung von Kreuz- oder Parallelresistenzen, die bei Substanzen mit verwandter chemischer Struktur und mit gleichem oder ähnlichem Wirkungsmechanismus vorkommen (FORTH et al., 1980), negativ auf die Resistenzsituation auswirken.

Die Möglichkeit einer Parallelresistenz mit halbsynthetischen Penicillinen (z.B. Ampicillin) erwähnt LACEY (1984). Er sieht einen Zusammenhang zwischen den Genen mit der Kodierung für die β -Laktamase-Produktion und den Genen für die CAP-Resistenz-Bildung. GÄRTNER und MÜLLER (1976) wiesen eine Kreuzresistenz zwischen Tetracyclinen und CAP bei Mikrokokken aus der Stalluft nach.

2.4.3 Therapeutische Anwendung

2.4.3.1 In der Humanmedizin

CAP besitzt ausgezeichnete antibakterielle und pharmakokinetische Eigenschaften (FORTH et al., 1980). Einer breiten Anwendung steht allerdings das Risiko hämatotoxischer Nebenwirkungen entgegen.

Und obwohl schon relativ früh auf diese Nebenwirkungen hingewiesen wurde, war die Anwendung von CAP lange Zeit weit verbreitet. Selbst bei sog. Banalinfekten, wie Erkältungen, wurde mit diesem Antibiotikum behandelt.

BEST (1967) stellte an Hand von 288 Patienten, die zwischen 1953 und 1964 mit CAP behandelt wurden und im Anschluß daran an einer Störung des Blutbildungssystems erkrankten in einer Übersicht die Primärerkrankungen zusammen, die zur Verschreibung des Antibiotikums führten.

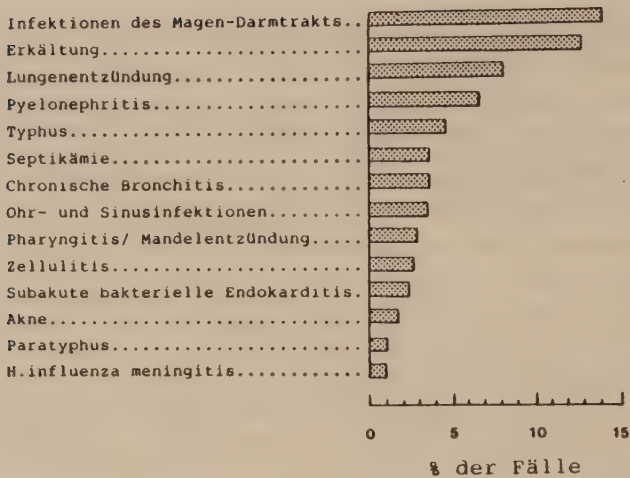


Abb. 3: Indikation für Behandlung mit CAP im Zeitraum von 1953-1964 (BEST, 1967)

Heute, nachdem die Hämatotoxizität und insbesondere die oft tödlich verlaufende aplastische Anämie als Nebenwirkungen hinlänglich bekannt sind, wurde der Einsatz von CAP stark eingeschränkt. Eine Therapie mit CAP soll sich auf wenige gefährliche Erkrankungen beschränken, hauptsächlich Salmonelleninfektionen (Typhus abdominalis und Paratyphus), eitrige Meningitiden (Haemophilus influenzae, Friedländer Meningokokken) und Infektionen des Bulbus oculi. Außerdem kann CAP als Reservemittel eingesetzt werden, wenn sonst besser geeignete Therapeutika unwirksam oder unverträglich sind (NEUMAN u. MAUR, 1981; PILLOUD, 1982).

Strenge Indikationsstellung und größte Sorgfalt bei der Durchführung der Therapie mit CAP sind angebracht. Dafür gibt die ARZNEIMITTELKOMMISSION der deutschen Ärzteschaft (1970) eine Reihe von Empfehlungen. Grundsätzlich sollte vor und während der Anwendung eine Kontrolle des Blutbildes durchgeführt werden. Die Gesamtdosis für Erwachsene soll

nicht über 30 g, die Tagesdosen zwischen 1,5 und 2 g liegen und die Behandlung nicht länger als 14 Tage dauern. Eine Wiederholung der CAP-Therapie soll vermieden werden.

Folgende Darreichungsformen stehen zur Verfügung:

- CAP- und CAP-Palmitat-Kapseln (geschmacksneutral) für die orale Verabreichung (4 mal tägl. alle 6 Std.)
- CAP-Succinat (sehr gute Wasserlöslichkeit) für die intravenöse Injektion.
- CAP in 0,5-1% wässriger Lösung als Augen- und Ohrentropfen

2.4.3.2 In der Veterinärmedizin

Laut BOERTZ (1984) waren 1984 318 CAP-haltige Präparate zugelassen. Davon waren 113 Mono- und 205 Kombinationspräparate. Die Applikation erfolgt i.v., i.m., oral oder örtlich (Spray oder Salbe) (TROLLDENIER, 1977).

Die wichtigsten Anwendungsgebiete lassen sich ungeachtet rechtlicher Verbote folgendermaßen zusammenfassen.

- Augeninfektionen (z.B. Weidekeratitis des Rindes) (Trockenspray lokal)
- Lungen- und Atemwegsinfektionen bei Pferd, Rind, Schaf, Schwein und Geflügel.
- Salmonelleninfektionen bei Rind, Kälbern und Schweinen (va. nekrotische Enteritis des Schweines).
- Nieren- und Harnwegsinfektionen durch gramnegative Erreger
- Infektiöse Klauenentzündungen (z.B. Moderhinke) (Aerosol)
- Bakterielle Erkrankungen durch gramnegative Infektionserreger (wie Salmonellen und Coliseptikämien der Kälber und des Geflügels).
- Bakterielle Infektionen bei Süßwasserfischen.

Bei einer durchschnittlichen Bakteriensensitivität von 0,5 - 5 µg/ml in vitro (minimale Hemmkonzentration (MHK) in vitro) (ENGLISH u. WITHEY, 1959) und einem Sicherheitsfaktor 5 sollte während der Behandlung die CAP-Konzentration nicht unter 25 µg/ml fallen (PILLOUD, 1973). Entsprechend muß die

zu verschreibende Menge und das Dosierungsintervall ausgerichtet werden.

TROLLDENIER (1977) empfiehlt bei einem Dosierungsintervall von 4 bis 12 Std. folgende Dosierungen.

- Rind: 20-30 mg/kg i.m.; 10 mg/kg i.v.;
- Kalb: 20-30 mg/kg i.m.; 50-100 mg/kg oral;
- Pferd: 20-50 mg/kg i.m.; i.v.; oral;
- Schwein: 25-50 mg/kg i.m.; i.p.; oral;
- Schaf: 50 mg/kg i.m.;
- Hund: 100-200 mg/kg oral; i.m.; Tagesdosis in Einzelgaben von 20-50 mg/kg;
- Katze: 50-200 mg/kg oral; i.m.; i.v.; Tagesdosis in 2-3 Einzelgaben;
- Geflügel: 40-60 mg/kg i.m.; 150-250 mg/kg Trinkwasser;
0,5% Futter für 8-12 Tage;

Breites Wirkungsspektrum, hohe Wirksamkeit, hervorragende pharmakokinetische Eigenschaften, kaum Nebenwirkungen auf das Tier und nicht zuletzt niedriger Preis sind die Faktoren, die CAP für den Einsatz in der auf Rentabilität ausgerichteten Tierproduktion und in der Tiermedizin so interessant machen.

Hinzu kommt ein weiterer, höchst zweifelhafter Aspekt, nämlich die Tatsache, daß der Nachweis von CAP bisher problematisch war.

Im sog. "Allgemeinen Hemmstofftest" für Muskulatur und Niere nach Anlage 4 der AB.A zum Fleischhygienegesetz ist der Nachweis von CAP-Rückständen in relevanten Größenordnungen nur begingt möglich (SCHULZE, 1986).

CAP war und ist oft das Mittel der Wahl für einen allerletzten Therapieversuch. Der Beweis, daß Wartezeiten (Tab. 3) nicht eingehalten wurden, ist schwierig zu erbringen.

Tab. 3: Wartezeiten für CAP in Anlehnung an BOERTZ (1984)

Tierart	Wartezeit in Tagen bei unterschiedlicher Anwendung				
	i.v. i.p.	i.m. und s.c.		oral	lokal
		Injektions- stelle	restlicher Tierkörper ¹		
Pferd ²	10	21	10	10	1
Rind ²	10	21	10	10	1
Kalb	10	21	10	10	1
Schwein	10	21	10	10	1
Schaf ²	10	21	10	10	1
Ziege ²	10	21	10	10	1
Geflügel ³	21	21	21	10	1
Fisch	60			30	
Kaninchen	10	21	10	10	1

¹ Diese Wartezeiten gelten nur, wenn die Injektionsstelle verworfen wird.

² Bei Tieren, die der Milchgewinnung dienen ist CAP verboten.

³ Bei Geflügel, das der Eigewinnung dient ist CAP ab Beginn der Legereife verboten.

2.4.4 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik dient der Beschreibung des Verbleibens eines in den Organismus gelangten Pharmakons, sowohl in örtlicher als auch in zeitlicher Hinsicht (KIETZMANN, 1983). Der zeitliche Ablauf der Wirkung eines Pharmakons wird durch die beiden gleichzeitig ablaufenden, aber einander entgegengerichteten Prozesse der Invasion und Evasion bestimmt und untergliedert sich in die Stadien der Resorption, Verteilung, Speicherung (Proteinbindung) und Elimination (FORTH et al., 1980). Diese Stadien versucht man durch mathematische Modelle zu quantifizieren. Grundlage für Berechnungen sind im Organismus gemessene Wirkstoffspiegel (KIETZMANN, 1983). Die ermittelten pharmakologischen Daten sind von Tierart zu Tierart verschieden (KAEMMERER u. KIETZMANN, 1983).

2.4.4.1 Resorption

Nach oraler Verabreichung wird CAP bei allen Monogastriern rasch und zu über 90% in den oberen Darmabschnitten vor allem über den Lymphweg resorbiert (NEUMAN u. MAUR, 1981). GORZELEWSKA und JUSKIEWICZ (1961) berichten von hohen Serumkonzentrationen nach oraler Anwendung von CAP beim Schaf. Die Mehrzahl der Untersucher schließen allerdings bei oraler Applikation einen Übergang von CAP ins Serum beim erwachsenen Wiederkäuer aus (THEODORIDES et al., 1968; DAVIS et al., 1972; SISODIA et al., 1973; CORTE-BAETEN u. DEBACKERE 1975 u. 1976 sowie BACKER u. DEBACKERE, 1979). SISODIA et al. (1973) machen dafür resistente Mikroorganismen im Pansen verantwortlich, die CAP inaktivieren. De CORTE-BAETEN und DEBACKERE (1978) konnten bei in vitro Versuchen eine rasche Biotransformation von CAP durch die Pansenmikrofauna (Ciliaten) nachweisen. Es handelt sich dabei um eine Metabolisierung durch Reduktion der aromatischen Nitrogruppe zum Arylamin.

2.4.4.2 Verteilung

Für pharmakokinetische Modelle wird der Organismus fiktiv in Kompartimente aufgeteilt, in und zwischen denen der Arzneistofftransfer abläuft. In einem Kompartiment werden alle Körperregionen bzw. Organe zusammengefaßt, zwischen denen sich das Pharmakon gleich schnell verteilt und sich kinetisch einheitlich verhält (KIETZMANN, 1983). Für die Verteilung von resorbiertem CAP wird allgemein das offene Zwei- bzw. Mehrkompartimentenmodell herangezogen, bei dem man von einem zentralen und von einem peripheren Kompartiment ausgeht (BAGGOT, 1978).

Als zentrales Kompartiment werden alle gefäßreichen Organe (Lunge, Leber, Herz und Niere) und das zirkulierende Blut bezeichnet. Den restlichen Körper mit den weniger gut durchbluteten Teilen wie Muskulatur, Haut, Binde- und Fettgewebe bezeichnet man als peripheres Kompartiment (MERCER et al., 1978; BAGGOT, 1978).

MERCER et al. (1978) konnten nach Rückstandsuntersuchungen an jungen Mastschweinen die konstanten Parameter der Gewebepenetrationrate und der Freisetzungsrates aus dem Gewebe berechnen. Aus den Ergebnissen kann abgeleitet werden, daß beim Schwein CAP doppelt so schnell aus dem Blutkreislauf ins Gewebe diffundiert, als es umgekehrt aus dem Gewebe wieder abgegeben wird.

Ein weiterer wichtiger Parameter ist in diesem Zusammenhang das Verteilungsvolumen. Da jede Substanz unter den gleichen Bedingungen immer den gleichen Raum einnimmt, ist das Verteilungsvolumen eine charakteristische Größe für ein Pharmakon. Aus Verteilungsvolumen (V) und Dosis (D) läßt sich die Höhe der Konzentration (Co) bestimmen, die ein Pharmakon nach beendeter Verteilung erreicht. Rechnerisch geschieht das nach der Formel:

$$Co = \frac{D}{V}$$

Setzt man das Verteilungsvolumen (V) in Relation zum Körpergewicht (KGW) erhält man den Distributionskoeffizienten Δ' .

$$\Delta' = \frac{V \text{ (l)}}{\text{KGW (kg)}}$$

Ist der Distributionskoeffizient größer als 1, verteilt sich das Pharmakon nicht nur in Serum oder Plasma sondern akkumuliert auch im Gewebe (BAGGOT, 1978; FORTH et al., 1980; DORRESTEIN et al., 1984). Umgekehrt ist bei einem Wert kleiner 1 die Serumkonzentration größer als die Konzentration im Gewebe.

Am einfachsten sind die pharmakokinetischen Verhältnisse bei einer intravenösen Verabreichung. Das Pharmakon tritt in das zentrale Kompartiment ein, die Metabolisierung und die Elimination gehen ausschließlich von hier aus. Die Eliminationsrate aus einem Kompartiment ist proportional zur Konzentration darin. Appliziert man das Pharmakon nicht in das zentrale Kompartiment (z.B. oral oder i.m.), muß zusätzlich die Absorption beachtet werden. In einem solchen System kommt es zu einer Überlagerung von Verteilung und Elimination.

Sehr komplex wird die Pharmakokinetik eines Arzneistoffes, wenn die Rückresorption, z.B. im enterohepatischen Kreislauf, und die Bildung von Metaboliten und deren Pharmakokinetik mitberücksichtigt werden.

CAP besitzt ausgesprochen günstige Eigenschaften für eine gute und rasche Verteilung im Körper. Nach DAVIS et al. (1972) ist das Verteilungsgleichgewicht zwischen Blut und Gewebe bei Hund, Ziege und Pferd (Pony) bereits in weniger als 30 Min. nach intravenöser Applikation erreicht. Da CAP ein niedriges Molekulargewicht besitzt und außerdem relativ lipophil und fast völlig undissoziiert vorliegt, kann es schnell biologische Membranen passieren und rasch nach Ver-

teilung im Blut in die Gewebe diffundieren. Hier liegt es dann sowohl intra- als auch extrazellulär vor (WALTER u. HEILMEYER, 1975; NEUMAN u. MAUR, 1981; WATSON u. McDONALD, 1976). Natürliche Barrieren, z.B. die Blut-Hirn-Schranke oder die Plazentaschranke, kann es beinahe ungehindert passieren. Schon kurze Zeit nach Erreichen der maximalen Blutspiegelwerte findet man bis 50% der Serumkonzentration im Liquor cerebrospinalis. Bei entzündeten Meningen ist sogar ein Anstieg bis auf volle Serumwerte möglich (FORTH et al., 1980). 57% der mütterlichen Blutkonzentrationen werden im fetalen Blut erreicht. Außerdem gelangt CAP in seröse Körperhöhlen (Pleura, Pericard, Synovia; 30-50% der Serumspiegel), in das Augenwasser, in die Cornea sowie nach Überschreiten der Blut-Euterschranke, in die Milch (WALTER u. HEILMEYER, 1975; TROLLDENIER, 1977). Durch Anreicherung in Lymphe und Lymphknoten erreicht CAP hier sogar höhere Spiegel als im Serum (NEUMAN u. MAUR, 1981).

1

2.4.4.3 Speicherung (Proteinbindung)

CAP wird über eine kovalente Bindung über den Dichloracetamidrest - nicht über die Nitrogruppe - an zelluläre Makromoleküle gebunden (SCHMID, 1983).

Etwa 50% des verabreichten CAP liegen in biologisch wirksamer, ungebundener Form vor; etwa 40-45% sind reversibel an Serumeiweiß gebunden (NEUMAN u. MAUR, 1981). Nach DAVIS et al. (1972) und PILLOUD (1973) gibt es erhebliche artspezifische Unterschiede hinsichtlich der Bindung von CAP an Plasmaproteine.

Hund	39,5	±	3,4	%
Katze	37,7	±	2,1	%
Schwein	35,1	±	2,5	%
Ziege	30,1	±	2,6	%
Pferd (Pony)	30,4	±	2,0	%
Mensch	46,0	±	0,46	%
Rind	47 - 60			%

Das Ausmaß der Bindung ist unabhängig von der Konzentration des Arzneimittels im Plasma (DAVIS et al., 1972; PILLOUD, 1973). Die an Plasmaproteine gebundenen CAP-Moleküle sind dem Metabolisierungsmechanismus entzogen (GERULL, 1981).

Neben dieser Bindung, vor allem an Serumalbumin, wird auch noch die Möglichkeit der Bindung an intrazelluläre Proteine in schwächer durchbluteten Geweben diskutiert. Die Folge wäre eine Speicherung und verzögerte Freisetzung, z.B. auch aus Muskelgewebe. Untersuchungen hierüber liegen von ENGLISH und WITHY (1959), ENGLISH und SEAWRIGHT (1961), WATSON und McDONALD (1976) sowie von MERCER et al. (1978) vor. GERULL (1981) kommt ebenfalls zu dem Schluß einer Eliminationsverzögerung durch Speicherung im Gewebe.

2.4.4.4 Metabolisierung (Biotransformation)

Die Metabolisierung von CAP erfolgt hauptsächlich in der Leber und erst in zweiter Linie in anderen Organen (WALTER u. HEILMEYER, 1975; TROLLENIER, 1977). Die weitgehend substratspezifischen Enzyme, die bei Um- und Abbau beteiligt sind, können sowohl an Zellstrukturen, z.B. Mikrosomen oder lipoidhaltige Membranen des endoplasmatischen Retikulums gebunden (z.B. Glukuronyltransferase, Monooxygenase), als auch strukturungebunden (z.B. Esterasen, Amidasen) im Cytosol gelöst vorliegen (SCHMID, 1983).

Den bedeutensten Metabolisierungsschritt verursachen mikrosomale Glucuronyltransferasen, für die eine gewisse Sub-

stratspezifität angenommen wird (SCHMID, 1983). Sie vermitteln die Konjugation der primären Alkoholgruppe der CAP-Seitenkette mit aktivierter Glucuronsäure (UDP-Glucuronsäure) (FORTH et al., 1980). Das entstehende CAP-Glucuronid ist weniger toxisch als die Muttersubstanz und antibiotisch nicht mehr aktiv. Durch Erhöhung der Polarität und der Wasserlöslichkeit ist eine schnellere Ausscheidung über die Nieren möglich. Gelangt CAP-Glucuronid mit der Galle in den Darmtrakt, so kann es durch bakterielle Glucuronidasen hydrolytisch gespalten und als aktives CAP innerhalb eines enterohepatischen Kreislaufes wieder rückresorbiert werden (MERCER et al., 1978; SCHMID, 1983).

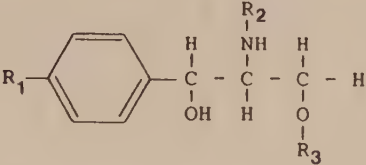
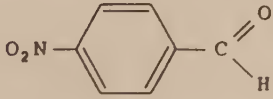
Dehalogenasen zählen zu den microsomalen Monooxygenasen und sind Sauerstoff- und NADPH-abhängig. Sie katalysieren eine Halogenabspaltung aus der Dichloracetyl-Seitenkette. Bei dieser Reaktion entstehen metabolische Radikale, die kovalent mit Sulfhydryl- bzw. Aminogruppen von Proteinen weiterreagieren können (SCHMID, 1983).

Durch Glutathion-S-Transferasen wird der nukleophile Ersatz eines Chloratoms durch Glutathion (GSH) am Dichloracetylrest katalysiert. Es entsteht ein Thioether, der mit nukleophilen Makromolekülen (Proteinen) weiterreagieren oder über verschiedene Zwischenschritte zu CAP-Aldehyd, -Alkohol oder -Oxamidsäure umgebaut werden kann (SCHMID, 1983).

Die Peptidbindung (-NH-CO-) in der Seitenkette von CAP und seinen Metaboliten wird durch Amidasen hydrolysiert. Aus CAP-Alkohol entsteht so Glykolsäure, aus CAP-Aldehyd Glyoxalsäure, und CAP-Oxamidsäure wird zur Oxalsäure umgeformt (GLAZKO, 1949b; KRISHNA et al., 1981; SCHMID, 1983).

Die mikrosomalen Nitroreduktasen reduzieren CAP und seine Metaboliten zu den entsprechenden Arylaminen. Die Arylamine sind antibakteriell nicht aktiv (KRISHNA et al., 1981), ihre Toxizität bedarf noch genauerer Klärung (WALTER u. HEILMEYER, 1975). In Abb. 4 wird die Metabolisierung von CAP schematisch dargestellt; in Tab. 4 sind die wichtigsten Metaboliten und Abbauprodukte zusammengefaßt.

Tab. 4: Metaboliten und Abbauprodukte von CAP (BOERTZ, 1984)

			
Substanz	R ₁	R ₂	R ₃
Chloramphenicol (CAP)	NO ₂	COCHCl ₂	H
CAP-Alkohol	NO ₂	COCH ₂ OH	H
Amino-CAP	NH ₂	COCHCl ₂	H
CAP-Base	NO ₂	H	H
reduzierte CAP-Base	NH ₂	H	H
Glykolsäuremetabolit	NO ₂	COCOOH	H
CAP-Glucuronid	NO ₂	COCHCl ₂	C ₆ H ₉ O ₆
Dichloressigsäure	Cl ₂ CH - COOH		
p-Nitrobenzaldehyd			

Zwischen den polaren Metaboliten und unverändertem CAP wird sehr schnell ein Gleichgewichtszustand erreicht, der bis zur endgültigen Ausscheidung im großen und ganzen unverändert bleibt. Der prozentuale Anteil von wasserlöslichen, polaren CAP-Metaboliten (meist CAP-Glucuronid) im Vergleich zur Muttersubstanz im Plasma differiert sehr stark zwischen den einzelnen Arten. Beim Rind liegen 30% des CAP als polare Metaboliten vor, beim Pferd sogar 75% (PILLOUD, 1973). Der CAP-Glucuronid-Anteil im Plasma beim Menschen wird mit 10% angegeben (WALTER u. HEILMEYER, 1975). Neugeborene Kinder können wegen einer physiologischen Enzyminszuffizienz in der Leber nicht in ausreichendem Maße CAP glucuronidieren. Als Abbauprodukt entsteht CAP-Alkohol, den man im Urin nachweisen kann (DILL et al., 1960).

Bekannt ist auch die Glucuronidierungsschwäche der Katze. CAP wird hier ebenfalls zum CAP-Alkohol abgebaut (DILL et al., 1960). KUNIN et al. (1959) vertreten die Ansicht, daß Katzen dennoch CAP glucuronidieren.

Bei Ratten und Meerschweinchen werden die Metaboliten bevorzugt über Galle und Faeces ausgeschieden. 50-80% der verabreichten CAP-Menge werden bei der Ratte in der Galle gefunden (GLAZKO et al., 1949b). Erst kürzlich konnte bei der Ratte der Glycolsäuremetabolit als ein neuer Hauptmetabolit entdeckt werden (BOERTZ, 1984). Die Metabolisierung von oral verabreichtem CAP durch Mikroorganismen im Pansen von adulten Wiederkäuern wurde schon unter 2.4.4.1 beschrieben.

2.4.4.5 Elimination

Die Ausscheidung von CAP aus dem Körper erfolgt nach den Gesetzmäßigkeiten einer Kinetik erster Ordnung. Das Pharmakon wird proportional seiner jeweiligen im Körper verbliebenen Konzentration ausgeschieden (BAGGOT, 1978). Die Geschwindigkeit der Elimination hängt dabei von der Aktivität der Enzyme, die das Pharmakon umbauen und von der Ausscheidung durch die Niere ab. Sie wird durch die sog. Halbwertszeit ($T_{1/2}$)

charakterisiert, die Aufschluß über den Zeitraum in dem die Konzentration des Pharmakons auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes abgesunken ist, gibt. Die Halbwertszeit ist eine wichtige Größe für die Beurteilung der Wirkungsdauer eines Arzneimittels und ist für jede Substanz kennzeichnend (FORTH et al., 1980; KIETZMANN, 1983). Berechnet wird sie, bei bekannter Eliminationskonstante (k_2), nach der Formel:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_2} = \frac{0,693}{k_2}$$

Nach intravenöser Injektion wurden folgende Plasmahalbwertszeiten ermittelt (TROLLENIER, 1977; PILLOUD, 1982):

Schwein	1,3 h
Rind (adult)	2,0 - 3,5 h
Kalb (3-4 Wochen alt)	5 - 6 h
neugeb. Kalb (1. Tag)	15 h
Pferd	1,0 - 1,1 h
Pony	0,9 h
Hund	4,2 h
Katze	5,1 h
Ziege	2,0 h
Rotwild	1,5 h

Die Nachweismethoden, mit denen obige Werte ermittelt wurden, ließen Messungen im Spurenbereich und somit über einen längeren Zeitraum nicht zu. Bei neueren Untersuchungen (BOERTZ, 1984) wurden wesentlich längere Halbwertszeiten für verschiedene Gewebe festgestellt.

Tab. 5: Halbwertszeit von CAP (terminale Ausscheidungsphase) in verschiedenen Geweben und Körperflüssigkeiten von Mastschweinen nach einmaliger Injektion von 30 mg CAP/kg KGW i.m. (BOERTZ, 1984)

Probe	T 1/2	
	h	Tage
Muskulatur	169	7,0
Plasma	157,5	6,6
Urin	165,0	6,9
Niere	306,7	12,8
Galle	245,4	10,2

An eine Phase der raschen Elimination schließt sich eine "terminale" Elimination an, bei der CAP nur langsam aus tiefen Kompartimenten freigesetzt und ausgeschieden wird (BOERTZ, 1984).

Trotzdem besitzt CAP verglichen mit anderen Antibiotika eine kurze Halbwertszeit. Bis zu 90% der verabreichten Menge wird innerhalb 24 Std. über die Nieren ausgeschieden. Der größte Anteil davon (85 - 90%) gelangt mittels tubulärer Sekretion in konjugierter Form, als CAP-Glucuronid, in den Urin. Zu 10-15% wird CAP in unveränderter, aktiver Form glomerulär filtriert (FORTH et al., 1980; SHALIT u. MARKS, 1984). Bei Neonataten und Jungtieren ist die glomerulär filtrierte, nicht metabolisierte CAP-Fraktion möglicherweise größer (SCHMID, 1983). Weitere Metaboliten, die renal ausgeschieden werden, stellen die Amino-CAP-Derivate (Arylamine) dar. Aufgrund geringer Selektivität der bisherigen Untersuchungsmethoden können sie nicht weiter klassifiziert werden. Ihr Anteil im Urin beträgt 4-8% (SCHMID, 1983).

Bei Leberinsuffizienz kann die Halbwertszeit von CAP infolge herabgesetzter Glucuronidierung stark verlängert sein. Bei Niereninsuffizienz steigt die Serumkonzentration von CAP nicht wesentlich an, dagegen kommt es zu einer Kumulation der inaktiven Metaboliten (CAP-Glucuronid, Arylamine) (FORTH et al., 1980; KUNIN et al., 1959).

Über die Galle werden ca. 3% der resorbierten CAP-Menge ausgeschieden. Der Anteil an freiem CAP in der Galle ist sehr gering (ca. 5%). In den Faeces werden nur etwa 1% der Dosis ausgeschieden (WALTER u. HEILMEYER, 1975). Für die Diskrepanz zwischen Galle- und Faeceswerten kann man eine Rückresorption über einen enterohepatischen Kreislauf verantwortlich machen (GLAZKO et al., 1949b).

CAP wird bei Kühen über die Milch (GEDEK, 1973; HAMANN et al., 1975; LIDL, 1983; de CORTE-BAETEN u. DEBACKERE, 1976) und bei Hennen durch Einlagerung ins Ei, vor allem in den Dotter aus dem Körper eliminiert (PETZ, 1984b; SCHWARZER, 1985; JOOS u. BAUM, 1986).

2.5 Wechselwirkung mit anderen Wirkstoffen

Durch CAP wird die Biotransformation verschiedener Pharmaka verlangsamt, die Wirkung dieser Stoffe wird somit verstärkt und verlängert. Hervorgerufen wird diese Wirkung durch eine Hemmung der Aktivität mikrosomaler Leberenzyme, vor allem Cholinesterase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und N-De-methylase, die an der Metabolisierung dieser Arzneistoffe beteiligt sind (HAPKE et al., 1977; HAPKE, 1979).

Die Beeinträchtigung der Metabolisierung von Dicumarolen, Phenytoin und Tolbutamid ist schon länger bekannt (FORTH et al., 1980). HAPKE (1979) stellte bei Ratten fest, daß CAP die Dauer der Hexobarbital- und Ketamin-Narkose dosisabhängig verlängert. Bereits die subcutane Injektion von 2 mg CAP

pro kg KGW verlängert die Narkosedauer auf die doppelte Zeit. Die Narkosewirkung von Thiamylal, einem Thiobarbiturat, wird bei Mäusen bei gleichzeitiger Verabreichung von CAP um über das 10fache verlängert (AZADEGAN et al., 1980). Die vorherige Applikation von CAP (100 mg/kg s.c.) erhöhte die Toxizität von intraperitoneal verabreichtem Procain und Lidocain. Die auftretenden motorischen Erregungen und Krämpfe waren stärker und dauerten länger, als bei CAP-freien Kontrolltieren (HAPKE et al., 1979).

Die Elimination von Tylosin wird bei Anwesenheit von CAP um über 100% verzögert (KIETZMANN u. KREISNER, 1983), ein Effekt, der in vielen Kombinationspräparaten ausgenützt wird.

Störende Interaktionen können dagegen mit bakterizid wirkenden Antibiotika (z.B. Penicillin und Streptomycin) auftreten; die Bakterizidie wird dabei wesentlich beeinflusst (WALTER u. HEILMEYER, 1975; TROLLDENIER, 1977).

Bei Puten kann die Kombination von oral verabreichtem CAP mit dem Kokzidiostatikum Monensin-Natrium zu Unverträglichkeiten und Intoxikationserscheinungen führen (DORN et al., 1983).

In Anwesenheit von Eisen, Folsäure und Vitaminen des B-Komplexes wird die Aktivität von CAP herabgesetzt (PILLOUD, 1982).

Die toxische Wirkung des Insektizids Parathion (E 605) wird da die enzymatisch bedingte Bildung des toxischeren Paraoxon durch CAP gehemmt wird wesentlich vermindert (HAPKE et al., 1977).

2.6 Toxizität

2.6.1 Toxische Wirkung auf den Menschen

Schon relativ frühzeitig wurden toxische Nebenwirkungen von CAP auf den Menschen erkannt. An oberster Stelle der Schädigungen steht dabei die des Knochenmarks, die in zwei Varianten auftreten kann.

2.6.1.1 Frühtoxizität

Noch während oder kurz nach der CAP-Therapie kann es zu einer toxischen Suppression der Erythropoese mit Störung des Eisenstoffwechsels (u.a. Anstieg des Serumeisens), Abfall des Hämatokritwertes und Abfall der Retikulozyten, Leukozyten und Thrombozyten kommen (BECK, 1975; FORTH et al., 1980). Bei Untersuchung des Knochenmarks läßt sich eine feine Vakuolisierung von unreifen Erythroblasten, und eine Zunahme der Sideroblasten feststellen (BECK, 1975). Als Hauptursache für diese Schäden wird die Störung der Proteinsynthese in den Mitochondrien angesehen. Da die mitochondriale Proteinsynthese in eukaryontischen Zellen (Säugetiere, Vögel) analog zu den Verhältnissen in prokaryontischen Zellen abläuft, kann es während einer CAP-Behandlung durchaus zu einer Beeinträchtigung mitochondrialer Enzyme (Ferrochelatase und Cytochromoxidase) und somit zu einer zytotoxischen Wirkung kommen (HAPKE, 1979). So ist z.B. die Aktivität der Ferrochelatase, welche den Einbau des 2-wertigen Eisens in das Protoporphyrin katalysiert, stark abgesenkt (SHALIT u. MARKS, 1984). Diese streng dosisabhängigen, reversiblen pharmakologischen Effekte treten nur während der CAP-Applikation auf und verschwinden wieder mit Beendigung der Therapie (HAPKE, 1979).

2.6.1.2 Spättoxizität

Wesentlich gefährlicher für den Menschen ist die Knochenmarkaplasie (Panmyelopathie), die zur aplastischen Anämie und/oder Granulozytopenie bzw. Thrombozytopenie führt (FORTH et al., 1980). Diese toxischen Erscheinungen treten erst 2 Wochen bis 6 Monate nach Beendigung der Therapie, gegebenenfalls schon nach einer hohen Einzeldosis auf (N.N., 1980). In der Literatur wird berichtet, daß CAP auch bei örtlicher Anwendung als Augentropfen eine tödlich verlaufende aplas-

tische Anämie verursachen kann (FRAUNFELDER et al., 1982). Der Mechanismus der CAP-bedingten aplastischen Anämie konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden.

Raum für Spekulationen läßt die Tatsache, daß Thiamphenicol, bei dem die aromatische Nitrogruppe durch eine Methylsulfonylgruppe ersetzt ist, keine aplastische Anämie verursacht (MANYAN et al., 1975; SCHMID, 1983). Das unterschiedliche biochemische Verhalten der Methylsulfonylgruppe des Thiamphenicol im Vergleich mit der p-Nitrogruppe von CAP könnte hierfür verantwortlich gemacht werden (MANYAN et al., 1975). Darüberhinaus wurden verschiedene Hypothesen über die Pathogenese der CAP-induzierten aplastischen Anämie aufgestellt. SCHMID (1983) setzt eine individuelle hereditäre Überempfindlichkeit (Idiosynkrasie) gegen CAP und/oder seine Metaboliten für die Entstehung einer aplastischen Anämie voraus. Individuelle "Enzymdefekte" mit modifizierter CAP-Metabolisierung oder eine individuelle "Regenerationsschwäche" des Knochenmarks sieht er als naheliegende Möglichkeiten für ihre Ursache.

Hinzu kommt eine zytotoxische Wirkung von CAP und/oder CAP-Metaboliten auf Knochenmarkstammzellen. Verantwortlich dafür könnte eine irreversible kovalente Bindung an zelluläre Makromoleküle im Knochenmark sein (SCHMID, 1983). FREEMAN et al. (1977) und YUNIS (1981) stellten eine dosisabhängige Hemmung der DNA-Synthese von Knochenmarkzellen, die nur von CAP, nicht von Thiamphenicol verursacht wird, als mögliche molekularbiologische Folge dieser Bindung fest.

Gefährlicher als CAP scheint ein Metabolit (Nitroso-CAP) zu sein, der die DNA-Synthese im Knochenmark stärker, und im Gegensatz zu CAP, irreversibel hemmt (GROSS et al., 1982). Als dritte Hypothese wird in der Literatur eine allergische Genese diskutiert (SCHMID, 1983).

Die Angaben über das Risiko, nach einer CAP-Behandlung an aplastischer Anämie zu erkranken, schwanken zwischen 1:20 000 und 1:100 000 (SCHMID, 1983). Hierzu liegen Unter-

suchungen aus verschiedenen Ländern vor (BEST, 1967; WALLER-STEIN et al., 1969; KEISER u. WALDER, 1970; BECK, 1975). SKRANDIES und HAUSMANN (1972) berechneten bei Untersuchungen im Kreis Hamburg sogar eine Krankheitshäufigkeit von 1 pro 11 430 Behandlungsfällen. CAP steht damit auf der Liste von Substanzen, die aplastische Anämie induzieren, an erster Stelle vor Phenylbutazon, Mephenytoin, Goldverbindungen und Tolbutamid (KEISER u. WALDER, 1970).

2.6.1.3 Sonstige Nebenwirkungen

Bei Früh- und Neugeborenen wurde bei falscher Dosierung ein sog. Gray-Syndrom beobachtet, das durch Erbrechen, Meteorismus, blasse Zyanose und einen unter Umständen tödlichen Kreislaufkollaps charakterisiert ist. In 40% der Fälle tritt der Tod innerhalb von 2-3 Tagen ein (SHALIT u. MARKS, 1984). Ursache ist eine geringere glomeruläre Filtration in der Niere und vor allem eine nicht ausreichende Glucuronyltransferaseproduktion in der Leber (physiologische Enzyminsuffizienz). Dadurch kommt es zu einer CAP-Kumulation mit den toxischen Auswirkungen (FORTH et al., 1980).

Zu einer Herxheimer-Jarisch-Reaktion kann es zu Beginn einer massiven Thyphustherapie kommen, wenn hohe Anfangsdosen gegeben werden. Endotoxine, die beim Zerfall der Bakterien freigesetzt werden sind dafür verantwortlich (FORTH et al., 1980). Eine untergeordnete Rolle spielen allergische Reaktionen. Sie liegen bei oraler und parenteraler Gabe unter 2%, und bei lokaler Anwendung zwischen 2 und 5% (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Bei hohen Dosen (über 2 g täglich) sind gastrointestinale Unverträglichkeiten nicht auszuschließen (NEUMAN u. MAUR, 1981).

Als potentiell hepatotoxische Substanz kann CAP Cholestase auslösen (KNOTHE u. DETTE, 1982).

Aufgrund der Hemmung der Messenger-RNS in den Blutkörperchen besitzt CAP eine gewisse immunsuppressive Wirkung (NEUMAN u. MAUR, 1981; PILLOUD, 1982)

2.6.2. Toxische Wirkung auf Tiere

GRUHZIT et al. (1949) untersuchten als erste die akute und die chronische CAP-Toxizität bei Tieren. Sie konnten nach CAP-Dosen, die nahe der toxischen Grenze lagen folgende klinische Erscheinungen beobachten: Respiratorische Insuffizienz, Blutdruckabfall, Sauerstoffmangel und vorübergehende renale Hämaturie (akute Toxizität). Die chronische Toxizität äußert sich in dosisunabhängigen und dosisabhängigen Veränderungen des weißen Blutbildes (TROLLDENIER, 1977).

Bei intramuskulärer Verabreichung von 0,5-1 g CAP in ölgiger Lösung oder in Propylenglykol treten beträchtliche lokale Gewebeindurationen und Nekrosen auf (GRUHZIT et al., 1949). Toxische Erscheinungen in Form reversibler Knochenmarksdepression mit Veränderung des Blutbildes (Lymphozytopenie, Neutrozytopenie) und zentralnervösen Störungen treten bei der Katze nach hohen CAP-Dosen auf (WATSON u. MIDDLETON, 1978; WATSON, 1980).

Saugferkel zeigen nach einer CAP-Überdosierung (1 000 mg/kg) akute Vergiftungserscheinungen und ein Krankheitsbild, das große Ähnlichkeit mit dem aus der Pädiatrie bekannten "Gray-Syndrom" hat (VAJDA u. BEKESY, 1981).

Allgemein kann jedoch festgestellt werden, daß CAP mit Ausnahme der Katze, bei Tieren nur geringe Toxizität besitzt (HAPKE, 1981). Hohe LD₅₀-Werte bestätigen das. (Tab. 6)

Tab. 6: Akute Toxizität von CAP (TROLLDENIER, 1977)

Tierart	Applikation	LD ₅₀
		mg CAP/kg KGW
Ratte adult	s.c.	5 000
Ratte juvenil	s.c.	350
Maus	i.v.	245
Maus	oral	2 640
Hund	i.v.	150
Hund	i.m.	100
Hund	oral	300

Die für den Menschen so gefährliche CAP-induzierte aplastische Anämie wurde bislang nur bei Holstein-Kälbern nach intravenöser und hoher oraler CAP-Gabe (100 mg/kg KGW und Tag) beobachtet (KRISHNA et al., 1981).

2.7 Beurteilung von CAP-Rückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs

Unter Rückständen versteht man alle gesundheitlich nicht unbedenklichen Bestandteile oder ihre Stoffwechselprodukte (Metabolite), die im Fleisch oder in sonstigen zur menschlichen Ernährung bestimmten Erzeugnissen des mit dem fraglichen Medikament behandelten Tieres vorhanden sind (HEGNER, 1981).

Nach KAEMMERER und KIETZMANN (1983) sollte bei der Rückstandsbewertung die Größe der "sekundären Verfügbarkeit" eines Arzneimittels mitberücksichtigt werden. Sie hängt ab von der technischen und/oder küchentechnischen Aufbereitung (Hitzestabilität), von den Verdünnungsfaktoren der Magendarm-Sekrete sowie von der Stabilität in den Verdauungssäften, von der Membranpassage im zweiten Durchgang und von der Bindungsform im tierischen Gewebe. Folglich sind Arzneimittelkonzentrationen, die als Rückstände vorliegen, pharmakologisch-toxikologisch anders zu bewerten, als die entsprechenden Konzentrationen eines Arzneimittels in Reinsubstanz.

Da man aber bisher für die CAP induzierte aplastische Anämie keine Dosis-Wirkungs-Beziehung aufstellen konnte, muß man davon ausgehen, daß CAP auch im niedrigen Konzentrationsbereich als Rückstand in Nahrungsmitteln eine aplastische Anämie auslösen kann. In letzter Zeit werden in steigendem Maße auch die Metaboliten von CAP in diese Fragestellung miteinbezogen (GROSS et al., 1982).

SCHMID (1983) vertritt die Ansicht, daß grundsätzlich nur metabolisch unverändertes CAP oder CAP-Metaboliten, die nach der Aufnahme durch den Konsumenten potentiell wieder in unverändertes CAP rücktransformiert werden können (vor allem CAP-Glucuronid) die Voraussetzung zur Induktion einer aplastischen Anämie erfüllen. Werden die gesetzlich vorgeschriebenen Wartezeiten eingehalten, liegen nur noch CAP-Metaboliten vor, die im tierischen Organismus kovalent an Makromoleküle gebunden sind. Eine erneute Bindung an Knochenmark-

zellen und somit eine Auslösung der aplastischen Anämie durch diese kovalent gebundenen Metaboliten erscheint unmöglich (SCHMID, 1983).

Eine Inaktivierung von CAP-Rückständen durch Erhitzen der Nahrungsmittel ist nicht zu erwarten, da CAP sehr hitzestabil ist. PETZ (1984a) stellte keine signifikanten Unterschiede im CAP-Gehalt von Hühnereiern vor bzw. nach 10 Min. Kochen fest.

2.8 Rechtsvorschriften

Nach § 15 LMBG vom 15. August 1974 ist es verboten, von Tieren gewonnene Lebensmittel gewerbsmäßig in den Verkehr zu bringen, wenn in oder auf ihnen Stoffe mit pharmakologischer Wirkung oder deren Umwandlungsprodukte vorhanden sind, die die festgesetzte Höchstmenge überschreiten.

In der "Dritten Verordnung zur Änderung der Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung" vom 5. April 1984 wird in Anlage 1 die Anwendung von CAP bei Tieren, die der Milchgewinnung dienen, während der Laktation und zwischen den Laktationsperioden und bei Geflügel, das der Eigewinnung dient, ab Beginn der Legereife verboten. Gleichzeitig wird in Anlage 2 für Eier, Eiprodukte, Milch und Milcherzeugnisse eine Höchstmenge von 0,001 mg CAP/kg (ppm) festgesetzt.

Diese Höchstmengenregelung ist bisher einmalig auf dem Gebiet der Arzneimittelrückstände, gilt aber nicht für Fleisch und Fleischerzeugnisse (SCHULZE, 1986). Die Möglichkeiten zur Kontrolle im Rahmen der Schlachttier- und Fleischuntersuchung werden durch die Ausführungsbestimmungen A (AB.A) zum Fleischhygienegesetz (FlHG) mit § 4 (4), § 20 (3,4) sowie § 27 (1) definiert. In Anlage 4 zur AB.A wird die Durchführung dieser Untersuchungen geregelt. Wird der in Anlage 6 Fleischhygiene-Verordnung (FlHV) festgesetzte Grenzwert für CAP von 10 µg/kg überschritten, ist nach Anlage 1 Kap. IV FlHV das geschlachtete Tier als untauglich zu beurteilen.

2.9 Nachweisverfahren

2.9.1 Mikrobiologische Verfahren

Bei diesen Verfahren macht man sich die Eigenschaft von CAP und anderen Antibiotika zunutze, spezifische Stoffwechselleistungen von Mikroorganismen und somit bakterielles Wachstum zu hemmen.

Bei den Agardiffusionsverfahren werden Bakterienstämme als Testkeime herangezogen, die gegen Hemmstoffe besonders empfindlich sind (*B. subtilis*, *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*, *Sarcina lutea*). Die zu untersuchende Probe wird auf dem mit dem entsprechenden Testkeim beimpften Nährboden aufgetragen und bebrütet. Um hemmstoffhaltige Proben findet kein Bakterienwachstum statt, es bilden sich sog. Hemmhöfe im Bakterienrasen. Dieser Test kann auch in flüssigem Medium durchgeführt werden, als Bewertungskriterium dient dann die verminderte Trübung des Kulturmediums. Die Größe der Hemmhöfe bzw. der Grad der Trübungsminderung dienen zur semiquantitativen Bestimmung der Hemmstoffmenge. Säuerungs- und Reduktionsverfahren (Laktathemmungstest, Methylenblau-Reduktionstest) finden speziell bei der Untersuchung von Milch Anwendung. Die zu untersuchende Probe wird mit einer Testkultur z.B. Joghurtkultur beimpft und bebrütet. Bei Vorhandensein von Hemmstoffen wird das Wachstum der Testkultur gestört, es findet keine Säuerung statt. HAMANN et al. (1980) konnten mit einem Laktathemmungstest eine Nachweisempfindlichkeit in Milch von 0,1 mg CAP/kg erreichen. Routinemäßige Untersuchungen von Milch auf Hemmstoffe werden mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) durchgeführt. Er stellt eine Kombination aus Agardiffusions- und Reduktionstest dar, wobei Brillantschwarz als Redoxindikator dient (KRAACK u. TOLLE, 1969).

Diese Tests zeigen zwar innerhalb kurzer Zeit das Vorliegen von Hemmstoffen an, allerdings ist bei allen mikrobiologischen Methoden nur eine semiquantitative Bestimmung der

Konzentration der Hemmsubstanzen und zudem keine Differenzierung der einzelnen Hemmsubstanzen möglich (TERPLAN u. ZAADHOF, 1967). Antibakteriell unwirksame Abbauprodukte von Antibiotika entziehen sich dieser Nachweismethode gänzlich. Zur eindeutigen Identifizierung eines bestimmten Antibiotikums können Trennverfahren (Hochspannungselektrophorese, Kurzzeit-Niederspannungselektrophorese) vorgeschaltet werden (LANGNER et al., 1973).

Obwohl Hemmstofftests für andere Antibiotika durchaus tauglich sind, sind die Resultate für CAP unbefriedigend. Deutlich wird das aus einer Gegenüberstellung verschiedener Antibiotika und mehrerer mikrobiologischer Nachweismethoden (INTERNATIONOL DAIRY FEDERATION, 1986). Die Nachweisgrenze für CAP beim BRT wird darin mit 15 mg/l angegeben.

Die geringe Nachweisempfindlichkeit mikrobiologischer Methoden bedingt häufig, daß dieses Antibiotikum in Milch und Fleisch nicht erkannt wird. SCHMIDT (1975) konnte CAP nur dann in Organen und Muskulatur quantitativ (1 ppm) nachweisen, wenn es 3 Std. vor der Schlachtung in therapeutischen Dosen verabreicht wurde. Nach 42 Std. war sogar an der Injektionsstelle kein CAP-Nachweis mehr möglich. Als Nachweisgrenzen werden für Fleisch 10 mg/kg und für Milch 2 mg/kg angegeben. Neuere Untersuchungen lieferten sogar Nachweisgrenzen von 0,25 mg/l Urin oder Serum, 0,025 mg/l Milch und 0,1 mg/kg Muskelgewebe (SINGER u. KATZ, 1985), die aber noch weit über den gesetzlichen Richtwerten liegen.

Verbesserte Verfahren, unter Einsatz des Enzyms β -Glucuronidase, das CAP-Glucuronid zu CAP und Glucuronsäure umsetzt (GLAZKO et al., 1950), liefern bei der Harnuntersuchung von Schlachttieren als Screeningtests durchaus brauchbare Resultate (KÖHLER, 1982; BOGAERTS et al., 1984).

2.9.2 Kolorimetrie

CAP besitzt im UV-Spektrum bei 278 nm ein Maximum und kann daher direkt photometrisch bestimmt werden. Die meisten photometrischen Nachweisverfahren beruhen jedoch auf der Bestimmung farbiger Reaktionsprodukte von CAP im sichtbaren Bereich des Spektrums.

Die ersten kolorimetrischen Bestimmungen wurden von GLAZKO et al. (1949a), BESSMAN und STEVENS (1950) sowie LEVINE und FISCHBACH (1951) entwickelt. Dabei erfolgt eine Reduktion der Nitrogruppe zum Amin mit anschließender Diazotierung und Kupplung mit N-(1-naphthyl)ethylendiamin (Bratton-Marshall-Reagenz).

Diese Methode ist unspezifisch und ermöglicht keine selektive Unterscheidung zwischen CAP und CAP-Metaboliten, die noch die aromatische Nitrogruppe besitzen. Die Ergebnisse werden als "CAP-Äquivalente" ausgedrückt (GLAZKO et al., 1950).

Kolorimetrische Verfahren werden wegen der geringen Empfindlichkeit (Nachweisgrenze zwischen 1 und 10 mg/kg) hauptsächlich zur Bestimmung von CAP in pharmazeutischen Präparaten empfohlen, obwohl auch biologisches Untersuchungsmaterial photometrisch bestimmt wurde (LAUE et al., 1980). In neueren Untersuchungen wird von einer Screening-Methode mit beachtenswerter Nachweisgrenze von 4 ppb CAP in Milch berichtet (SCHWARTZ u. McDONOUGH, 1984).

PIETTA et al. (1979) erarbeiteten eine Methode zur CAP-Basen-Bestimmung, DEVANI et al. (1981) bestimmten mit ihrem Verfahren CAP, CAP-Succinat und CAP-Palmitat.

2.9.3 Polarographie

Bei diesem elektrochemischen Nachweisverfahren wird die aromatische Nitrogruppe von CAP an einer Quecksilberelektrode stufenweise reduziert. Unter Aufnahme von vier Elektronen wird die Nitrogruppe zunächst zum Hydroxylamin und

anschließend unter Aufnahme von zwei weiteren Elektronen zum Amin reduziert. Die quantitative Bestimmung erfolgt auf der Reduktionsstufe des Hydroxylamins durch Auswertung der Stromspannungskurven (HESS, 1950). Bei seinen Untersuchungen konnte HESS (1950) gleiches polarographisches Verhalten zwischen CAP und CAP-Base feststellen. DUMANOVIC et al. (1971) berichten über die polarographische Bestimmung der CAP-Base in einem Reaktionsgemisch bei der CAP-Synthese.

Die polarographische Reduktion von CAP-Palmitat ist ebenfalls möglich, allerdings erfolgt dabei eine starke Adsorption an die Quecksilberelektrode (PFLEGEL u. SHOUKRALLAH, 1973 u. 1974).

Die Polarographie ist gut geeignet für den CAP-Nachweis in pharmazeutischen Präparaten, in denen kaum störende Substanzen zu erwarten sind (SUMMA, 1965; UNTERMANN u. WEISSBUCH, 1974).

Die direkte Bestimmung von CAP in Milch ist in einem Bereich von 3-60 µg/ml nach Zugabe der gleichen Menge Phosphatpuffer möglich (FOSSDAL u. JACOBSON, 1971). Van der LEE et al. (1980) beschreiben mit der Hochleistungs-Differential-Puls-Polarographie ein verbessertes Verfahren, mit dem CAP in Milch und Muskulatur nach Extraktion mit Diethylether bis zu 3 ng/ml nachgewiesen werden kann.

2.9.4 Fluorometrie

Bei der fluorometrische CAP-Bestimmung wird die Nitrogruppe unter Erhitzen mit Zinkstaub in salzsaurer Lösung zum Amin reduziert, und anschließend bei einem pH von 4,3-5,0 mit Fluorescamin versetzt. Die Fluoreszenz der entstehenden Verbindung kann sofort im Fluorimeter gemessen werden (CLARENBURG u. RAO, 1977).

Die Nachweisempfindlichkeit variiert je nach Untersuchungsmaterial und wurde für Galle und Leber mit 600 ng/g, Muskel 100 ng/g und Plasma mit 60 ng/g angegeben.

Mit dieser Methode wurden Verteilungs- und Ausscheidungsstudien bei Ferkeln durchgeführt (RAO u. CLARENBURG, 1977).

2.9.5 Chromatographie

Allen chromatographischen Methoden ist gemeinsam, daß an einer unbeweglichen (stationären) Phase eine bewegliche (mobile) Phase vorüberströmt. Unterschiedliche Verteilungs- und/oder Adsorptionskoeffizienten bewirken, daß die einzelnen Komponenten des zu trennenden Gemisches von der mobilen Phase verschieden schnell mitgeführt werden.

Für den Nachweis von CAP-Rückständen in Milch, Eiern und eßbarem Gewebe wurden eine Reihe von chromatographischen Verfahren mit unterschiedlichen Detektionssystemen entwickelt. ALLEN (1985) faßt die neueren in einem detaillierten Überblick zusammen.

2.9.5.1 Papier- und Dünnschichtchromatographie

Bei dieser Technik verteilen sich die zu trennenden Substanzen zwischen zwei flüssigen Phasen. Das an der Cellulosefaser haftende Wasser wird als stationäre und das jeweilige Fließmittel als mobile Phase bezeichnet. Die Substanzen verteilen sich zwischen den beiden Phasen in einem Verhältnis, das durch den Verteilungskoeffizienten charakterisiert ist. Je löslicher eine Substanz in der mobilen Phase ist, um so weiter wird sie in Richtung Lösungsmittelfront wandern.

BETINA (1964) wandte das papierchromatographische Trennverfahren mit mikrobiologischer Detektion zum Nachweis von CAP in Antibiotikagemischen an. DILL et al. (1960) wiesen damit einen CAP-Metaboliten nach.

Die Dünnschichtchromatographie stellt eine auf dem selben Prinzip beruhende, genauere und leistungsfähigere Weiterentwicklung dar. Als stationäre Phase finden Cellulose-, Aluminiumoxid- oder Polyamidplatten, vor allem aber Kieselgelbeschichtete Glasplatten Verwendung. Die Fließmittelzusammensetzung (mobile Phase) variiert dabei beträchtlich.

Die Detektion kann mikrobiologisch (Bioautographie), polarographisch, fluorometrisch oder durch Sichtbarmachung im UV-

Licht (bei 278 nm) erfolgen. Angewendet wurde die Dünnschichtchromatographie zur Abtrennung von CAP-Metaboliten (SHIH, 1971a; PIETTA, 1979), -Estern (LIN et al., 1966) oder strukturähnlichen Substanzen wie Thiamphenicol (JANSSEN u. VANDERHAEGHE, 1975). Der dünnschichtchromatographische Nachweis von CAP in Milch wurde von TAKESHITA und YAMASHITA (1972), HAMANN et al. (1975) sowie BOSSUYT et al. (1976), im Ei von KARKOCHA (1979) und in eßbarem Gewebe von TAKESHITA u. YAMASHITA (1972), ALLIN (1976) sowie JOHANNES et al. (1983) beschrieben. Die Nachweisgrenzen liegen in Milch bei entsprechender Vorkonzentrierung (HAMANN et al., 1975) und im Ei (KARKOCHA, 1979) bei 10 ppb, in Gewebe bei 50 ppb (JOHANNES et al., 1983). Die meisten Methoden ermöglichen allerdings nur semiquantitative Aussagen über den CAP-Gehalt. Die von JOHANNES et al. (1983) entwickelte Methode mit visueller Detektion wurde weitgehend als amtliche Methode zur Untersuchung von Fleisch und Organen übernommen (N.N., 1983).

2.9.5.2. Gaschromatographie (GC)

Mit der GC lassen sich Substanzen nachweisen, die sich bei hohen Temperaturen unzersetzt verdampfen lassen und von denen man flüchtige Derivate reproduzierbar herstellen kann (MEYER, 1980).

Die zu trennenden Substanzen werden von einem inerten Gas (meist Stickstoff) durch eine Säule transportiert, in der auf festes Trägermaterial nichtflüchtige Trennflüssigkeiten (stationäre Phase) aufgezogen sind.

Entsprechend ihrer unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten trennen sich die Probenkomponenten zwischen der mobilen Phase (Trägergas) und der stationären Phase (flüssiges Material) auf. Die Quantifizierung der getrennten Substanzen erfolgt mit geeigneten Detektoren. Diese sind meist mit einem Integrator verbunden, der, sobald eine Verbindung den Detektor passiert, ein Signal (Peak) registriert.

Da CAP selbst nicht flüchtig ist muß es zu einem flüchtigen Derivat umgesetzt werden. Die Silylierung zum Trimethylsilylether (TMS) erhält meist den Vorzug. JANSSEN u. VANDERHAEGHE (1973) beschäftigten sich ausgiebig mit der Silylierung von CAP. Über die Derivatisierung mit Heptafluorbuttersäureanhydrid (HFBA) (HOLTMANNSPÖTTER u. THIER, 1982; WAL et al., 1979), mit Acetanhydrid und zum cyclischen Phenylboronatester wird in der Literatur ebenfalls berichtet (BOERTZ, 1984). Die Detektion mit einem Elektroneneinfangdetektor (ECD) besitzt hinsichtlich Spezifität und Empfindlichkeit wesentliche Vorteile gegenüber dem Flammenionisationsdetektor (FID), der früher häufig eingesetzt wurde. Eine hohe Elektronegativität, bedingt durch die beiden Chloratome und durch die Nitrogruppe, ist Voraussetzung für gute ECD-Empfindlichkeit.

Massenspektrometrische Bestimmungen erlauben zwar eine absolute Identifikation der aufgetrennten Substanzen, für routinemäßigen Gebrauch ist sie allerdings weniger gut geeignet (PICKERING et al., 1979).

Über den CAP-Nachweis in biologischem Untersuchungsmaterial mit GC wird vielfach berichtet (HAMANN et al., 1975; SEEFELD u. DUNSING, 1976; WAL et al., 1979; HOLLSTEIN et al., 1981; KUTTER et al., 1982; BORIES et al., 1983; MALISCH et al., 1984; LÖSCHER et al., 1985; BERGNER-LANG u. KÄCHELE, 1985). Beachtenswert sind bei der GC die niedrigen Nachweisgrenzen. MALISCH und SANDMEYER (1984) erreichten in Milch, Eiern und Fleisch 1 ppb, BERGNER-LANG und KÄCHELE (1985) mit ihrer Schnellmethode in Milch sogar 0,1 ppb.

Nachteilig für einen großrahmigen Einsatz der GC in der Lebensmitteluntersuchung ist die unbedingte Erfordernis aufwendiger Reinigungsschritte und die Derivatisierung.

Die gleichzeitige Bestimmung von CAP, Strukturähnlichen und Abbauprodukten (Thiamphenicol, CAP-Base, CAP-Glucuronid) wurde von NAKAGAWA et al. (1975) beschrieben.

2.9.5.3 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Technische Unzulänglichkeiten waren dafür verantwortlich, daß die Flüssigkeitschromatographie lange im Schatten der GC stand. Mit der Entwicklung von Hochdruckpumpen mit niedrigen Pulssequenzen, von Säulen und Injektionssystemen, die dem Hochdruck angepaßt sind und von leistungsfähigen Detektionssystemen waren die Voraussetzungen geschaffen, ein neues leistungsstarkes Trennverfahren, die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (High Pressure/Performance Liquide Chromatography, HPLC) als Methode der Wahl einzusetzen. Das Wirkungsprinzip der HPLC beruht auf der Polarität der mobilen Phase gegenüber der Polarität der stationären Phase.

Bei der Untersuchung auf CAP hat sich das "reversed phase system", bei dem die stationäre Phase weniger polar als die mobile Phase ist (im Gegensatz zum "straight phase system") durchgesetzt. Als stationäre Phase wird Überwiegend an Silicagel gebundenes Octadecylsilan (ODS) verwendet. Die mobile Phase ist immer ein Gemisch aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel, meist Methanol. Da Wasser in keinerlei Wechselwirkung zu den apolaren, hydrophoben Alkylgruppen der stationären Phase treten kann, ist es das schwächste aller Lösungsmittel, und eluiert die Proben am langsamsten. Der Verteilungskoeffizient eines Stoffes ist dafür verantwortlich, in welcher Phase sich der Stoff bevorzugt aufhält.

Am Ende der Trennsäule wird die Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase mit einem Detektor und über einen Schreiber, in Form von Peaks (von der Nulllinie abweichende Gaußkurven) sichtbar gemacht. Die Peaks werden für eine qualitative und quantitative Auswertung der Proben herangezogen (MEYER 1980).

CAP wird am häufigsten mit UV-Detektoren bei 254 oder 278 nm bestimmt. Die Detektion kann auch über Fluoreszenz (GERULL, 1981), polarographisch (van der LEE, 1981) oder elektrochemisch (SCHMIDT et al., 1985) erfolgen. Die verwendeten

Säulen haben eine Länge von 100, 250 oder 300 mm, einen Durchmesser von 2,1-4,0 mm und sind mit Partikeln mit einer Kerngröße von 3-10 μm gepackt. Das Injektionsvolumen variiert von 5-50 μl .

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von Arbeiten über den CAP-Nachweis in Milch, Eiern und eßbarem Gewebe veröffentlicht (RUSSEL, 1978; WAL et al., 1980; van der LEE, 1981; KUTTER et al., 1982; BECHEIRAZ et al., 1983; JOHANNES et al., 1983; LIDL, 1983; PLATE, 1983; PETZ, 1983 u. 1984; SCHMIDT et al., 1985). Eine amtliche Methode zum routinemäßigen Nachweis von CAP in Fleisch und Organen wurde im Bundesgesundheitsblatt veröffentlicht (N.N., 1983).

Als Nachweisgrenzen werden in Eier und Fleisch 10 ppb (BECHEIRAZ et al., 1983) in Milch sogar 5 bzw. 1 ppb (WAL et al., 1980; van der LEE, 1981; de RUIJ u. HOOIJERINK, 1985) erreicht. Die meisten Untersuchungen beschäftigen sich mit der quantitativen Bestimmung von CAP. Die Identifizierung und Bestimmung von CAP-Metaboliten, für die die HPLC hervorragend geeignet wäre, findet kaum Beachtung.

2.9.6 Radioenzymatischer CAP-Nachweis

Grundlage dieses Nachweisverfahrens ist die enzymatisch katalysierte Veresterung der CAP-Hydroxylgruppen. In Anwesenheit von CAP-Acetyltransferase (Katalysator) wird CAP mit ^{14}C radioaktiv markiertem Acetyl-Coenzym A acetyliert. Das entstehende ^{14}C -Acetoxy-CAP wird im Flüssigszintillationszähler gemessen. Die Radioaktivität von acetyliertem CAP ist proportional zur ursprünglich vorhandenen CAP-Menge (LIETMAN et al., 1976; ROBINSON et al., 1978; SMITH u. SMITH, 1978).

Anwendung fand diese Methode bei der Untersuchung von Körperflüssigkeiten, die dabei erreichte Nachweisgrenze betrug 500 ppb (PICKERING et al., 1979).

2.9.7 Immunologische Nachweisverfahren

Zur Durchführung immunologischer Nachweisverfahren benötigt man geeignete Antikörper, die man durch gezielte Immunisierung von Wirbeltieren mit geeigneten Antigenen (Immunogene) erhält. Niedermolekulare Verbindungen, die für sich allein nicht antigen wirken (Haptene), können erst nach Kopplung an Trägerproteine eine Immunantwort auslösen und zur Produktion von Antikörpern herangezogen werden. Die chemische Kopplung ist so zu wählen, daß die wichtigsten Strukturelemente, im Hinblick auf den angestrebten spezifischen Nachweis erhalten bleiben. Da auch das Trägermolekül eine Immunantwort auslösen kann, sollen gleichzeitig möglichst viele Haptenmoleküle am Trägermolekül gebunden werden, so daß die determinanten Gruppen des Trägerproteins weitgehend maskiert sind. Die Affinität und die Bindungskapazität eines Antiserums sind für die Empfindlichkeit eines Testsystems verantwortlich und werden hauptsächlich vom Verhältnis der gekoppelten Antigenmoleküle pro Trägerprotein, sowie von den immunreaktiven Eigenschaften des zur Serumgewinnung verwendeten Tieres beeinflusst. Die Spezifität der Antikörper wird dagegen direkt durch die Position und die Art der Kopplung des Antigens am Trägerprotein festgelegt (LÜBKE u. NIEUWEBOER, 1978; SCHUURS u. van WEEMEN, 1980).

Zur Synthese von Immunogenen für niedermolekulare Verbindungen haben sich eine Reihe von Verfahren bewährt, die zu einer kovalenten Verknüpfung des Antigens mit dem Trägerprotein führen. Neben den von ERLANGER et al. (1957) beschriebenen klassischen Carbodiimid- und gemischten Anhydrid-Methoden können auch die Imidazolid- oder die aktivierte Ester-Methode angewendet werden (LÜBKE u. NIEUWEBOER, 1978). Erste Untersuchungen zur Produktion von CAP-spezifischen Antikörpern wurden von HAMBURGER (1966) durchgeführt. Zur Immunogenherstellung reduzierte er die Nitrogruppe zum Amin und koppelte mittels Diazotierung an das Trägerprotein (bovines Gamma-Globulin).

Das Prinzip aller immunologischen Nachweisverfahren basiert im wesentlichen auf den Wechselwirkungen von Antigen, einem "Tracer" (markierte Antigene bzw. Antikörper) und Antikörper, bei der Bildung eines Antigen-Antikörperkomplexes. Markiertes Antigen, das die gleichen antigenen Determinanten wie das unmarkierte haben soll und nicht markiertes Antigen konkurrieren um die limitierten Bindungsstellen am Antikörper. Nach einer bestimmten Reaktionszeit stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht ein. Nach dem Massenwirkungsgesetz wird umsomehr unmarkiertes Antigen gebunden, je höher sein prozentualer Anteil im Vergleich zu markiertem Antigen ist und umgekehrt (DWENGER, 1984). Die Bestimmung der Antigen-Antikörper-Bindung erfolgt nach den Gesetzmäßigkeiten der kompetitiven Proteinbindung. Damit Messungen durchgeführt werden können, muß die an Antikörper gebundene von der freien Tracerfraktion mit geeigneten Verfahren getrennt werden. Je nach Anwendungsgebiet werden Adsorptionsmethoden, z.B. mit Dextran beschichtete Aktivkohle, Fällung des Immunkomplexes mit Ammoniumsulfat, Doppel-Antikörpermethode oder sog. "Solid-Phase-Verfahren" (Festkörperphase), bei denen die Antikörper an einen unlöslichen Träger kovalent oder adsorptiv gebunden sind, verwendet (LÜBKE u. NIEUWEBOER, 1978; SCHUURS u. van WEEMEN, 1980).

Immunologische Nachweisverfahren (RIA, EIA) zeichnen sich durch universelle Einsatzmöglichkeit, große Spezifität, hohe Empfindlichkeit und hohen Probendurchsatz aus und gewinnen deshalb in letzter Zeit immer mehr an Bedeutung.

2.9.7.1 Radioimmunologischer Nachweis (RIA)

Alle radioimmunologischen Nachweisverfahren gehören zu den sog. Proteinbindungsreaktionen. Für einen guten RIA sind folgende Voraussetzungen wesentlich: Lösungen mit bekanntem Antigengehalt für die Eichkurve, ein spezifischer Antikörper, ein radioaktiv-markiertes Antigen von hoher spezi-

fischer Aktivität, eine hinreichende Inkubationszeit und eine geeignete Methode zur Trennung des Antigen-Antikörperkomplexes von freien, ungebundenen Fraktionen.

Der RIA beruht auf der Konkurrenzreaktion von einem Isotopmarkiertem und einem nichtmarkiertem Antigen um die freien Bindungsstellen am Antikörper. Hält man die Konzentration der Antikörper und der markierten Antigene konstant und erhöht stetig die Konzentration von unmarkiertem Antigen, so nimmt die Radioaktivität im Antigen-Antikörperkomplex stetig ab (COOPER, 1981; DWENGER, 1984).

Die Inkubation der Proben soll so gewählt werden, daß sich zwischen freien und gebundenen Fraktionen ein Gleichgewichtszustand einstellen kann. Bevor man den radioaktiven Anteil im Antigen-Antikörperkomplex oder im freien Anteil bestimmen kann, muß man den Immunkomplex von freien Fraktionen trennen. Nach dieser Trennung erfolgt die Messung der Radioaktivität im Szintillationszähler.

Zur "Tracermarkierung" wird unter anderem häufig Tritium verwendet. Der Tritiumkern zerfällt unter Emission von β -Strahlung (Elektronen) in einen Heliumkern. Die Aktivität des β -Strahlers (Tritium-markierter Tracer) kann im β -Szintillationszähler bestimmt werden. Dabei wird die Strahlungsenergie in einem lumineszierenden Lösungsmittel (Szintillator) in Lichtblitze (Szintillationen) umgewandelt, und dann indirekt über einen Photodetektor (Photomultiplier) gemessen (WILLIAMS u. WILSON, 1978).

Der größte Störeinfluß auf das RIA-Meßsystem wird durch den sog. Quencheffekt ausgeübt. Man unterscheidet ein optisches Quenchen (vor allem bei schmutzigen Szintillationsgefäßen), ein Farbquenchen bei farbigen Proben und das chemische Quenchen, bei dem durch chemische Reaktionen zwischen in der Probe enthaltenen Substanzen und der Szintillationsflüssigkeit die Anzahl der gemessenen Szintillationen niedriger ist, als die Anzahl der tatsächlichen Zerfälle (WILLIAMS u. WILSON, 1978).

HOCK und LIEMANN (1985 u. 1986) beschreiben einen RIA mit ^{14}C markiertem CAP und einem CAP-spezifischen-Kaninchen-Antiserum. Zur Immunogenherstellung wurde CAP-Hemisuccinat und 3'-CAP- β -Monoglucuronid mit der Carbodiimid- oder der gemischten Anhydrid-Methode an Trägerprotein gekoppelt. Zur Trennung der freien und gebundenen Aktivität fällten sie nach Zugabe von Gamma-Globulin den Immunkomplex mit Ammoniumsulfat.

Der von ARNOLD et al. (1984) am BGA, Berlin entwickelte CAP-spezifische RIA wurde inzwischen von vielen Untersuchern zum Nachweis von CAP in Lebensmitteln erfolgreich eingesetzt (BOERTZ, 1984; SCHWARZER, 1985; AGTHE u. SCHERK, 1986; DORN et al., 1986; JOOS u. BAUM, 1986; RATTENBERGER et al., 1986; SCHERK u. AGTHE, 1986) und als amtliche Untersuchungsmethode nach § 35 LMBG in der "Allgemeinen Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Untersuchungen nach dem Fleischhygienegesetz (VwVfLHG)" vom 11. Dez. 1986 übernommen. Sein Testablauf soll später noch genauer beschrieben werden.

2.9.7.2 Enzymimmunologischer Nachweis (EIA)

Zur Markierung der Konjugate werden häufig die Enzyme Peroxidase, alkalische Phosphatase oder β -D-Galactosidase verwendet (SCHUURS u. van WEEMEN, 1980). Die quantitative Erfassung des enzymmarkierten Konjugates erfordert im Normalfall keine aufwendigen Spezialapparaturen. Die enzymatische Aktivität läßt sich anhand des Substratumsatzes mit den klassischen spektrophotometrischen Methoden der klinisch-chemischen Analytik bestimmen. Weiterhin entfallen alle Probleme, die durch den Umgang mit radioaktiven Isotopen entstehen.

Zur Trennung des gebundenen vom freien Tracer haben sich Festkörperphase-Methoden bewährt.

Über den enzymimmunologischen Nachweis von CAP gibt es nur wenige Arbeiten. CAMPBELL et al. (1984) entwickelten einen

kompetitiven indirekten ELISA, bei dem CAP in Form eines CAP-BSA-Konjugates (Bovines Serum Albumin) an die Festkörperphase gebunden wird. Zur Antiserumherstellung immunisierten sie Kaninchen mit CAP-KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) als Immunogen, das mit Hilfe der Carbodiimid-Methode synthetisiert wurde. Das CAP-spezifische Antiserum bildet entweder mit dem an den Festkörper gebundenen CAP oder mit dem freien CAP aus der zu untersuchenden Probe einen Komplex. Nach der Trennung kann der an die Festkörperphase gebundene CAP-Antiserum-Komplex nach Zugabe von anti-Kaninchen - Ziegen-IgG - Meerrettich-Peroxidase-Konjugat über die enzymatische Umsetzung von Wasserstoffperoxid spektral-photometrisch gemessen und damit indirekt die Menge des freien CAP berechnet werden. Als Nachweisgrenze für diese Methode wird 1 ng/ml (ppb) angegeben.

Der von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1987) vorgestellte ELISA soll im Rahmen dieser Arbeit mit dem CAP-RIA verglichen werden und wird später noch genauer beschrieben.

Seit kurzem ist in den USA und in den Niederlanden ein enzymimmunologischer Schnelltest zum qualitativen CAP-Nachweis in wäßrigen Lösungen im Handel erhältlich (Quik-card; Aesculaap B.V., PO Box 35, Boxtel, the Netherlands).

Auf eine Testkarte ist eine konstante Menge Antikörper aufgetragen, der mit CAP aus der Probe oder mit enzymmarkiertem CAP (CAP-Meerrettichperoxidase) einen Komplex bildet. Durch die Zugabe eines spezifischen Substrates kommt es innerhalb von 10 Min. bei CAP-haltigen Proben zu keinem, bei CAP-freien Proben zu einem blauvioletten Farbumschlag. Werden störende äußere Faktoren beseitigt, kann die vom Hersteller angegebene Nachweisgrenze von 25-50 ppb auf 2 ppb (Eier) bzw. 1-10 ppb (Muskelgewebe) gesenkt werden (NOUWS et al., 1987a u. b).

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Geräte und Reagenzien

3.1.1 RIA

β -Szintillationszähler mit integriertem Rechner: Beckman LS-5801; quenched Tritium Standards (Beckman Nr. 566683); Dispensette für Szintillationscocktail: Brand Dispensette 5-25 ml; Dosiervorrichtung für Aktivkohle, Antiserum und Tracer: LKB Handdispensor; Meßflaschen mit Schnellverschluß aus ND-Polyethylen (Roth); Szintillationscocktail (Roth Rotiszint 22); Tracer (Chloramphenicol, 3-Hydroxy-3(4'-nitrophenyl)-2-(N (3 H) propionyl)-amino- propan-1-ol; Amersham International TRK 854); Antiserum (BGA Berlin).

Phosphatpuffer: pH 7,2-7,4

17,7 mmol/l KH_2PO_4 ; 46,9 mmol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 5,0 mmol/l NaN_3

Aktivkohlesuspension:

0,4 % Norit A; 0,05 % Dextran T 70; 0,025 % Schafserumalbumin in Phosphatpuffer

Beschreibung des Antiserums

Entsprechend ihrer Bedeutung sollen das im RIA verwendete Antiserum und der Radioligand (Tracer) ebenso wie das Antiserum und das Konjugat für den ELISA (siehe 3.1.2) genauer beschrieben werden.

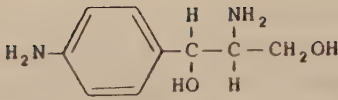
Die Entwicklung des Antiserums wurde von STÖFFLER am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin, durchgeführt (ARNOLD, 1985). Als Immunogen wurde "Iodamphenicol" (Mono-iodoacetylanalogon des CAP) verwendet, das über die Acyl-Seitenkette an Rinderserumalbumin gekoppelt wurde. Immunisierung und Serumgewinnung wurden an einem Schaf vorgenommen.

Affinität, Bindungskapazität und Spezifität des Antiserum wurden von ARNOLD et al. (1984) ausführlich beschrieben und werden daher im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Die Beurteilung der Spezifität erfolgte an Hand von Kompetitionsversuchen, bei denen insgesamt 30 Substanzen, vor allem strukturähnliche Verbindungen, auf Kreuzreaktionen und Selektivität ausgetestet wurden. Lediglich Metaboliten, die sich in der Struktur der Acyl-Seitenkette von der Muttersubstanz unterscheiden, wie z.B. der Glycolsäuremetabolit, der bei der Ratte als ein Hauptmetabolit auftritt, können stärkere Kreuzreaktionen verursachen. Die wichtigsten Kompetitoren und ihre äquivalenten Konzentrationen zeigt Abb. 5.

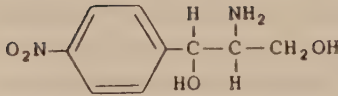
Aufgrund der hohen Affinität der Antikörper ist eine hohe Verdünnung des Antiserums möglich. Es wurde in einer Endverdünnung von 1:100 000 in Phosphatpuffer, das entspricht 1:160 000 im Ansatz, mit 0,025 % Schafserumalbumin-Zusatz eingesetzt. In Abwesenheit von CAP (Puffer-blank) und unter geeigneten Versuchsbedingungen werden dann ca. 40-50% des Radioliganden, ausgedrückt als maximale Bindung (B_{max}), an Antikörper gebunden.

Beschreibung des Radioliganden

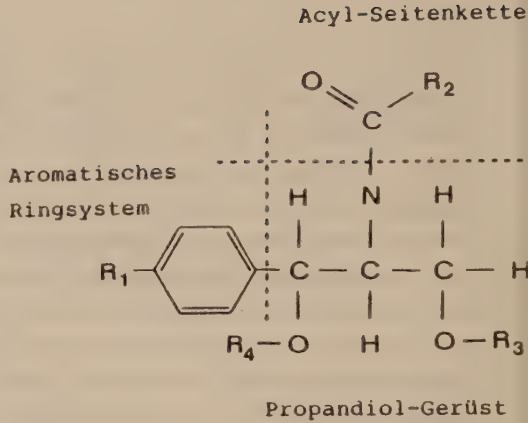
Als Tracer diente das N-Propionylanalogon des CAP, bei dem die Dichloressigsäure in der Seitenkette, durch Tritium-markierte Propionsäure substituiert wurde. Die genaue chemische Bezeichnung lautet 3-Hydroxy-3(4'-nitrophenyl)-2-(N (3H) propionyl-aminopropan-1-ol; die spezifische Aktivität beträgt 90,0 Ci/mmol. Durch Verdünnen in Phosphatpuffer wurde der Tracer auf eine Aktivität von ca. 10 000 CPM (counts per minute) bzw. 20 000 DPM (disintegrations per minute) in der Arbeitsverdünnung eingestellt.



No. 4



No. 6



No	KOMPETITOR	AQUIVALENTE DOSEN (pg/Ansatz)	R ₁	R ₂	R ₃ /R ₄
1	Chloramphenicol	137	NO ₂	CHCl ₂	H
2	Thiamphenicol	270000	CH ₃ SO ₂	-	-
3	p-Aminophenyl Analogon	1100000	NH ₂	-	-
4	"Reduzierte Base"	730000	siehe Formel No. 4		
5	1,3-Di-O-acetyl- chloramphenicol	110000	-	-	O=C-CH ₃
6	Chloramphenicol-"Base"	11000	siehe Formel No. 6		
7	"Glycolsäuremetabolit"	79	-	CH ₂ OH	-

Abb. 5: Spezifität des CAP-RIA. Äquivalente Dosen, die 50% Herabsetzung der Bindung des Radioliganden unter den üblichen Testbedingungen bewirken (ARNOLD u. SOMOGYI, 1985)

3.1.2 ELISA

Photometer: Dynatech Microelisa Auto Reader MR 580; Rechner: Hewlett Packard HP 85 B; Mehrkanalpipette: Socorex Zwölfkanalpipette 50-250 μ l; Taumler (Heidolph, Reax 3); Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno Plate I); Antiserum (eigene Herstellung); Konjugat (CAP-Monosuccinat-HRP; eigene Herstellung); Substrat (21 mmol/l 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, gelöst in Aceton/Methanol (1:10)); anti-Kaninchen-Schaf-IgG (Sigma Nr.R-4880 und eigene Herstellung, 0,01 mg/ml Carbonatpuffer);

Carbonatpuffer: pH 9,6

15,0 mmol/l Na_2CO_3 ; 34,9 mmol/l NaHCO_3

Kaliumcitratpuffer:

209,6 mmol/l Citronensäuremonohydrat; 200,6 mmol/l KOH; auf pH 3,95 einstellen; Zugabe von 3 mmol/l H_2O_2 ;

PBS-Puffer: pH 7,3

3,2 mmol/l KH_2PO_4 ; 10,4 mmol/l Na_2HPO_4 ; 116,2 mmol/l NaCl;

Waschlösung:

146,3 mmol/l NaCl; 0,25 % Tween 20;

Beschreibung des Antiserums

Zur Antiserumgewinnung wurden Kaninchen mit einem CAP-Base-HSA-Konjugat immunisiert. Bei der Immunogenherstellung wurde ausgehend von CAP-Base mit Hilfe der aktivierten Ester-methode unter Verwendung eines bifunktionellen Imidoesters (Dimethyladipimidat) das Hapten an Humanserumalbumin (HSA) gekoppelt.

Die Herstellung des Antiserums und die Untersuchungen zur Empfindlichkeit und Spezifität wurden bereits ausführlich beschrieben (MÄRTLBAUER u. TERPLAN, 1987). Von der Position

der Haptenkopplung her betrachtet (die Kopplung erfolgte über die Aminogruppe der Propandiol-Seitenkette) sind nur Substanzen, die an der Acylseitenkette von der Konfiguration der Muttersubstanz abweichen (z.B. Glycolsäuremetabolit), zu Kreuzreaktionen stärkeren Ausmaßes fähig. Strukturverwandte Verbindungen, wie CAP-Base oder Thiamphenicol beeinflussen das Testsystem wenig. Andere Antibiotika (z.B. Tetracycline, Gentamicin, und Ampicillin) zeigen erwartungsgemäß keine Beeinflussung. Das Antiserum gelangte in einer Verdünnung von 1:33 333, gelöst in PBS-Puffer zum Einsatz, was einer Verdünnung von 1:100 000 im Ansatz entspricht.

Beschreibung des enzymmarkierten Konjugates

Da durch eine heterologe Testanordnung wesentlich empfindlichere Nachweismethoden erstellt werden können wurde zunächst CAP mit Bernsteinsäureanhydrid zu einem Hemisuccinat, CAP-Monosuccinat (CAP-MS) umgesetzt, und dann mit Hilfe der Carbodiimidmethode unter Verwendung von N-Hydroxysuccinimid und Dicyclohexylcarbodiimid an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Die genauen Reaktionsabläufe beschreiben MÄRTLBAUER und TERPLAN (1987).

Das CAP-MS-HRP-Konjugat wurde 1:80 000 (1:240 000 im Ansatz) in 1%igem fetalen Kälberserum/PBS gelöst eingesetzt.

3.1.3 Probenaufbereitung

Evaporator (Haake Buchler, Vortex-Evaporator Evapotec); Stomacher (Colworth Stomacher 80 und 400); Moulinette S (Moulinex); Dispensetten für Acetonitril und Ethylacetat (Brand Dispensette 1-5 ml); Dosiervorrichtung für n-Hexan (Kippautomat aus Glas, 3 ml).

3.1.4 Sonstige Laborgeräte und Hilfsmittel

Zentrifuge: Heraeus Varifuge RF; Waagen: Satorius research R 160 p und Satorius 3716; Reagenzglasschüttler: Janke & Kunkel IKA VF 2; Magnetrührer: Janke & Kunkel IKA Combimag RCH; pH-Meter: WTW pH DIGI 510; Pipetten (Eppendorf Vari-
petten 4710 0,5-10 μ l; 10-100 μ l; 100-1000 μ l); Reagenz-
gläser (Typ I Assistent 75x12 mm Nr.2775/6; Typ II Assistent 100x16 mm Nr.2775/14).

3.1.5 Sonstige Chemikalien

Aceton	(Merck Nr. 14)
Acetonitril	(Merck Nr. 17)
Aktivkohle Norit A	(Serva Feinbiochemica Nr. 30890)
Chloramphenicol krist.	(Sigma Nr. C-0378)
Citronensäure-Monohydrat	(Merck Nr. 244)
Dextran T 70	(Pharmacia Fine Chemicals Nr. 4765)
Ethanol	(Merck Nr. 983)
Ethylacetat	(Merck Nr. 10972)
n-Hexan	(Merck Nr. 4371)
H ₂ O ₂ (Perhydrol 30% H ₂ O ₂)	(Merck Nr. 7209)
H ₂ SO ₄	(Merck Nr. 731)
fetales Kälberserum (FCS)	(Flow Laboratories Nr. 29-101-54)
KH ₂ PO ₄	(Merck Nr. 4873)
KOH	(Merck Nr. 9918)
Methanol	(Merck Nr. 6009)
NaCl	(Merck Nr. 6405)
Na ₂ CO ₃	(Merck Nr. 6392)
NaHCO ₃	(Merck Nr. 6329)
Na ₂ HPO ₄	(Merck Nr. 6586)
Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	(Merck Nr. 6580)
NaN ₃	(Merck Nr. 822335)
Schafserumalbumin Fraktion V Powder	(Sigma Nr. A-3264)
Tetramethylbenzidin	(Sigma Nr. T-2885)
Tween 20	(Sigma Nr. P-1379)

3.2 Methodik

3.2.1 Radioimmunoassay (RIA)

Der RIA wurde in enger Anlehnung an die von ARNOLD et al. (1984) beschriebene Methode durchgeführt.

Zur Erstellung der Eichkurve wurden ausgehend von einer Stammlösung (0,1 mg CAP/ml Ethanol) und einer Zwischenverdünnung (0,001 mg CAP/ml PBS) durch entsprechendes Weiterverdünnen in Phosphatpuffer CAP-Standardlösungen mit Konzentrationen von 10 000; 5 000; 2 500; 1 250; 625; 312,5; 125,25; 78,125 und 50 pg/ml hergestellt.

Für einen Testansatz wurden nacheinander 0,2 ml Standardlösung (bzw. Puffer oder Probe), 0,1 ml Tracer und 0,5 ml Antiserumverdünnung jeweils im Doppelansatz in Reagenzgläser (Typ I) pipettiert.

Nach Durchmischen auf dem Reagenzglasschüttler wurde der Ansatz unter standardisierten Bedingungen inkubiert. Die Inkubation muß ausreichend lang sein, damit sich ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Antigen und Antikörper im Ansatz einstellen kann. Empirische Untersuchungen zeigten, daß optimale Meßergebnisse nach 20 Std. Inkubation im Eis/Wasserbad erreicht werden (BOERTZ, 1984). Eine Verkürzung der Inkubation auf bis zu 4 Std. bei Raumtemperatur ist zwar möglich, führt aber zu unbefriedigenderen Ergebnissen.

Die Trennung der überschüssigen, nicht gebundenen Antigen- und Radioligandmoleküle von dem Antigen-Antikörperkomplex erfolgt durch Adsorption an Dextran-beschichtete Aktivkohle und anschließende mechanische Trennung durch Zentrifugation. Dazu wurde in jedes Reagenzglas 1 ml Aktivkohlesuspension pipettiert, kurz geschüttelt, 30 Min. im Eis/Wasserbad inkubiert und schließlich 15 Min. zentrifugiert (alle Arbeiten mit der Zentrifuge wurden bei 4°C und 3000 g durchgeführt). Der Überstand, in dem sich nur noch der Antigen-Antikörperkomplex befindet, wurde auf 12 ml Szintillationsflüssigkeit in Meßfläschchen dekantiert, durchmischt, und schließlich

die Aktivität des Tracers im β -Szintillationszähler gemessen. Die Zählzeit betrug maximal 5 Minuten, wenn nicht zuvor "2% Fehler", vor allem bei Proben mit hoher Aktivität, unterschritten wurde. Der Kanal für die Messungen wurde auf den Bereich zwischen 0 (lower limit) und 400 (upper limit) keV eingestellt, in dem das gesamte Spektrum von Tritium liegt. Die Testauswertung erfolgte computergestützt.

Da bei Voruntersuchungen festgestellt wurde, daß die in Puffer gelösten CAP-Standards zum Erstellen der Eichkurve einen niedrigeren Quench, und damit eine niedrigere H-Nummer aufwiesen als die Probenextrakte, wurden die zunächst in CPM angegebenen Meßwerte unter Berücksichtigung des "Quench-effekts" auf DPM korrigiert.

Aufgrund der Möglichkeiten, die das verwendete Meßgerät bot, wurde die H-Nummer-Methode (N.N., 1985) der Kanalverhältnis-Methode vorgezogen. Mit Hilfe einer Quenchkurve, die aus einem im Handel erhältlichen, vorgefertigten Satz aus gequenchten Tritium-Standards angefertigt, und als Unterprogramm im Computer gespeichert wurde (Abb. 6) läßt sich einer bestimmten H-Nummer die jeweilige "counting efficiency" zuordnen. Die Umrechnung auf DPM ergibt sich aus der Formel:

$$\text{counting efficiency} = \frac{\text{CPM}}{\text{DPM}}$$

Nachdem aus den DPM-Werten der einzelnen CAP-Standards (B) und dem DPM-Wert des Puffers (Puffer-blank, $B_{\max}$) der Quotient ($B/B_{\max}$) gebildet wurde, konnte mittels "spline approximation" die Eichkurve erstellt werden. Unbekannte Proben werden unter Bezugnahme auf die Eichkurve, durch Interpolation bestimmt.

Entsprechend dem kompetitiven Testsystem ist die gemessene Radioaktivität umgekehrt proportional zum CAP-Gehalt der Probe.

Den schematischen Ablauf des CAP-RIA zeigt Abb. 7, eine für den RIA typische Eichkurve ist in Abb. 8 dargestellt.

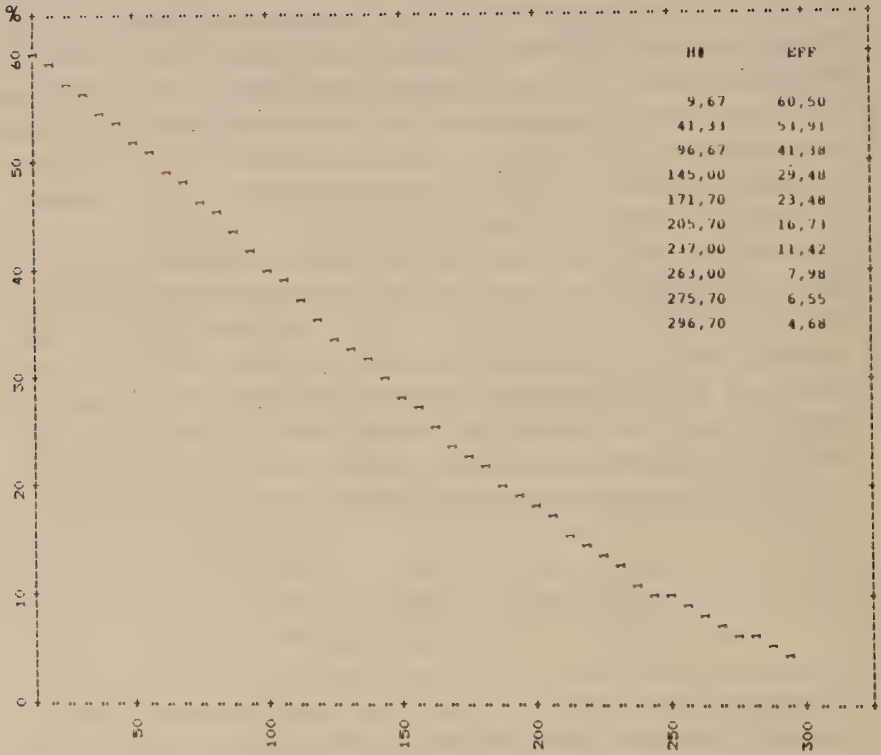


Abb. 6: Quenchkurve für Tritium; x-Achse = H-Nummer (H#)
y-Achse = counting efficiency (%) (EFF)

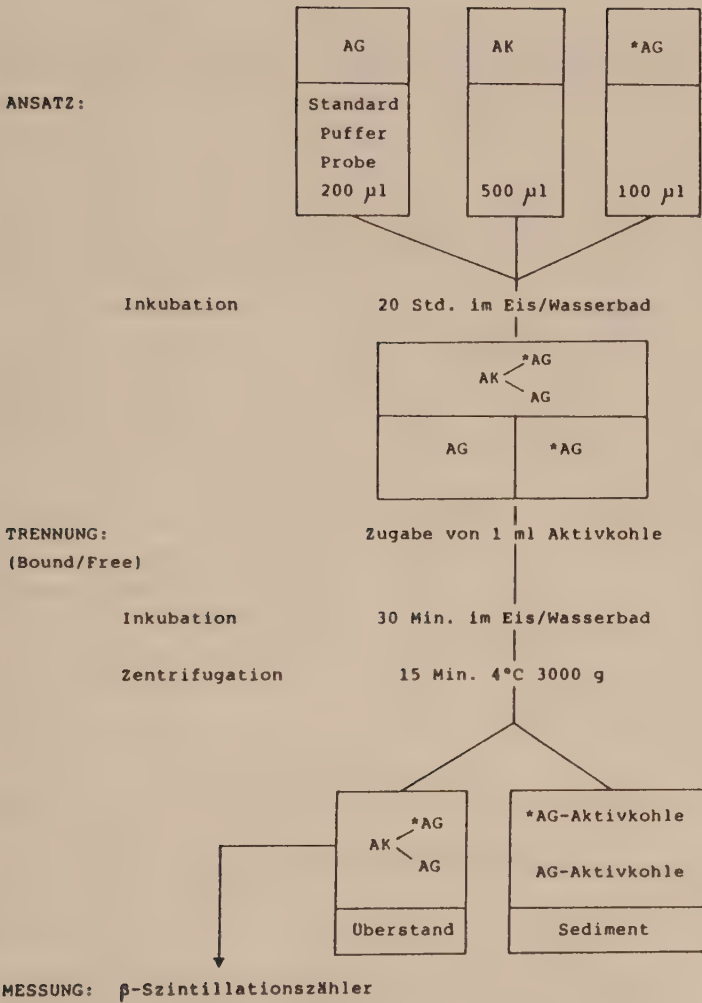


Abb. 7: Schematischer Ablauf des CAP-RIA, (AG = Antigen, *AG = Tracer, AK = Antikörper)

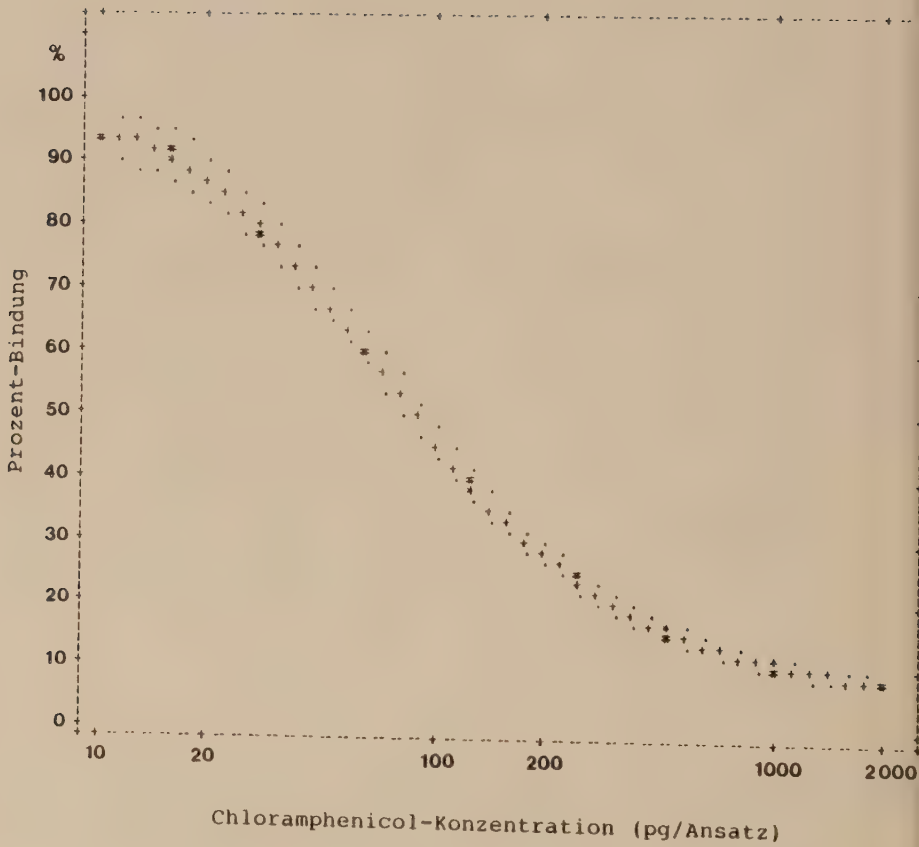


Abb. 8: Computerausdruck einer charakteristischen Eichkurve zum CAP-Nachweis mittels RIA; x-Achse = pg CAP/ 200 μ l Phosphatpuffer; y-Achse = Prozent-Bindung; (* = Einzelmeßwert, # = Mittelwert, + = berechneter Kurvenverlauf, . = Vertrauensgrenze 90 %)

3.2.2 Enzymimmunologischer Nachweis (ELISA)

Von der Testanordnung her handelt es sich um einen direkten, kompetitiven, heterologen ELISA, bei dem ein zweiter Antikörper, der an einen Festkörper gebunden vorliegt, spezifisch mit dem Immunkomplex reagiert (Abb. 9). Dieses Verfahren zur Trennung von freiem und gebundenem Tracer wird "Double Antibody Solid Phase (DASP)" Technik bezeichnet, und wurde in der Hormonforschung erprobt (KATO et al., 1979).

Die Festkörperphase bilden Mikrotiterplatten aus Polystyrol, die nach der Methode von MEYER (1986) mindestens 24 Std. mit in Carbonatpuffer gelöstem, affinitätschromatographisch gereinigtem anti-Kaninchen-Schaf-IgG (0,1 ml pro Kavität) beschichtet wurden. Nach Ausklopfen der Platten wurden unspezifische Bindungsstellen mit 3%igem FCS/PBS (0,2 ml pro Kavität) mindestens 30 Min. abgesättigt. Die Platten sind, nachdem sie mit Waschlösung 3mal gespült und trockengeklopft wurden, für den Ansatz vorbereitet.

Zur Erstellung der Eichkurve wurden aus derselben Zwischenverdünnung, wie sie für den RIA Verwendung fand (0,001 mg CAP/ml PBS), Standardlösungen mit CAP-Gehalten von 4 000; 1 333,33; 444,44; 148,15; 49,38; 16,46 pg/ml in PBS verdünnt. Jeweils 0,05 ml Standardlösung bzw. PBS-Puffer als 100%-Wert oder die unbekannte Probe wurden in die entsprechenden Kavitäten (im 4fach Ansatz) der vorbeschichteten Mikrotiterplatten pipettiert.

Anschließend wurden mit einer Mehrkanalpipette 0,05 ml CAP-HRP-Konjugat und 0,05 ml Antiserum zugegeben und inkubiert. Ähnlich wie beim RIA liefern kurze Inkubationszeiten (4 Std. bei Raumtemperatur) unbefriedigendere Ergebnisse. Größte Genauigkeit wurde bei Inkubation über Nacht (16-20 Std. bei 4°C auf dem Taumler) erreicht. Am nächsten Tag wurden die Platten 3mal mit Waschlösung gespült und ausgeklopft.

Dadurch wird nicht gebundenes CAP-Konjugat aus den Kavitäten entfernt. Der gebundene Anteil reagiert nun über die Peroxidase mit dem Substrat. Das zu 21 mmol/l in Aceton/

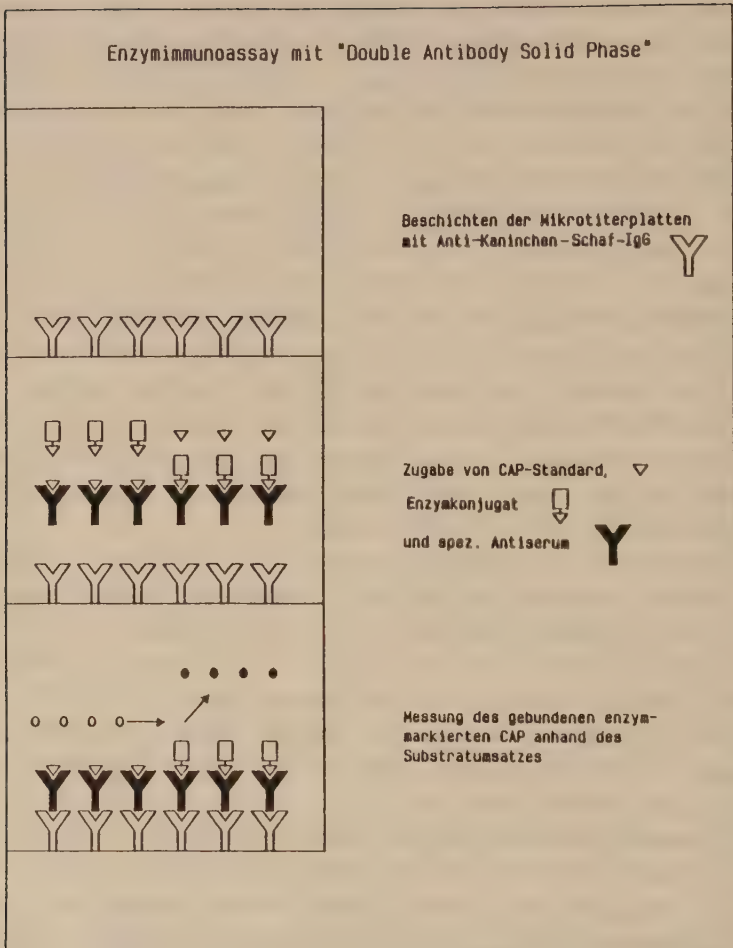


Abb. 9: Reaktionsprinzip des CAP-ELISA (schematisch)

Methanol gelöste Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) wird erst unmittelbar vor dem Einsatz mit Kaliumcitratpuffer auf 1 mmol/l verdünnt, und jeweils 0,1 ml davon werden in die Kavitäten pipettiert. Der Substratumsatz wird nach genügender Farbentwicklung nach ca. 10-15 Minuten mit 0,1 ml 1 M Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei 450 nm photometrisch gemessen.

Bei der Computerauswertung der Meßdaten wurden aus den Quotienten der einzelnen Standardmeßwerte zum Puffermeßwert, ausgedrückt als Prozent-Bindung ($B/B_{\max}$), mittels "spline approximation" die Eichkurve (Abb. 10) erstellt. Wie beim RIA, liegt auch beim ELISA eine kompetitive Testanordnung vor, d.h. die gemessene Extinktion ist umgekehrt proportional zum CAP-Gehalt der Probe.

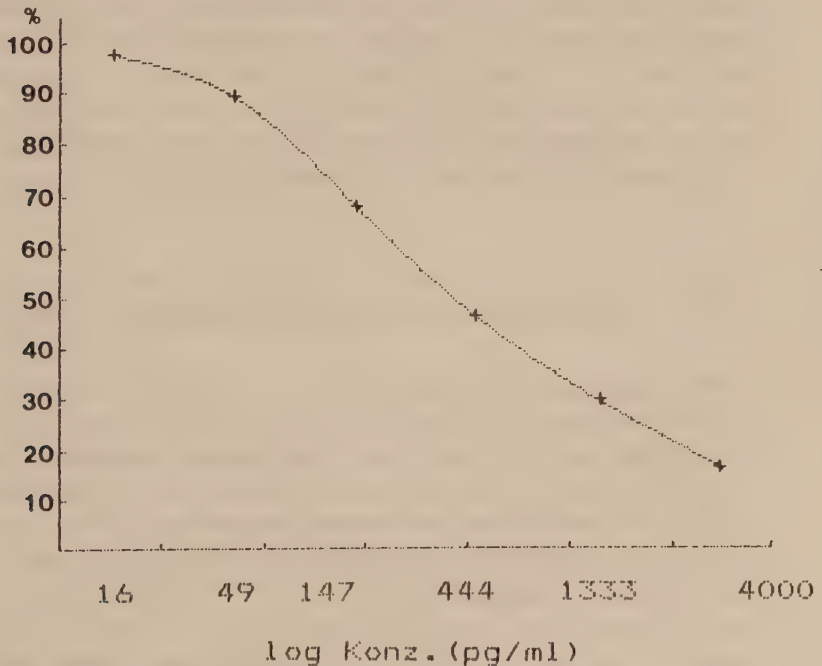


Abb. 10: Computerausdruck einer charakteristischen Eichkurve zum CAP-Nachweis mittels ELISA; x-Achse = CAP-Konzentration, y-Achse = Prozent-Bindung

3.2.3 Untersuchung von Milch mittels RIA und ELISA

Abweichend zu den Ausführungen unter 3.2.2 wurde der ELISA speziell den Bedürfnissen für die Milchuntersuchung angepaßt.

Zur Herstellung der CAP-Standardlösungen und zum Verdünnen des CAP-spezifischen Antiserums wurde anstelle des PBS-Puffers ein Gemisch aus Vollmilch und PBS im Verhältnis 1:3 verwendet.

3.2.3.1 Probenaufbereitung

Milch kann im RIA und im ELISA ohne aufwendige Aufarbeitung direkt untersucht werden. Fettreiche Milch wurde lediglich durch Zentrifugieren (15 Min. 4°C 3000 g) grob entfettet.

Im ELISA sollte darauf geachtet werden, daß der prozentuale Anteil der Milch im Testansatz 10% nicht übersteigt, da sonst das ELISA-System unspezifisch beeinflußt werden kann, und falsch-positive Ergebnisse möglich sind. Dementsprechend sind die Verdünnungsfaktoren zu wählen.

3.2.3.2 Untersuchung von künstlich kontaminierter Milch

Vollmilch wurde *in vitro* mit 0,5; 1; 2; 5; 10 und 100 ng CAP/ml (ppb) versetzt. Das CAP wurde in der Milch durch ausreichendes Schütteln auf dem Reagenzglasschüttler homogen verteilt. Nach dem Zentrifugieren gelangte die mit CAP "gespikte" Milch direkt oder entsprechend verdünnt zur Untersuchung. Die nicht mit CAP versetzte Ausgangsmilch diente als Kontrolle (Blindwert).

3.2.3.3 Untersuchung von natürlich kontaminierter Milch

Zur Gewinnung von "gewachsener" CAP-haltiger Milch wurde am Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim eine Schwarzbunte Kuh mit mittlerer Milchleistung mit einer einmaligen Verabreichung von 5 g CAP (Chloromycetin-Lösung 20%, Parke-Davis) behandelt. Bei einem Schätzwertgewicht von 500 kg KGW entspricht das einer Dosis von 10 mg CAP/kg KGW.

Das Medikament wurde intramuskulär, auf 2 Injektionsstellen verteilt, verabreicht. Vor der Injektion wurde eine Milchprobe als Kontrollmilch entnommen. Die erste CAP-haltige Probe wurde ca. 8 Std. nach der CAP-Verabreichung mit dem Abendgemelk gewonnen. Die weiteren Probenentnahmen erfolgten etwa im 12 Std.-Intervall, morgens und abends zu den jeweiligen Melkzeiten. Ab dem 6. Tag nach der Injektion wurde nur noch das Morgengemelk untersucht.

3.2.4 Untersuchung von Hühnereiern mittels RIA und ELISA

3.2.4.1 Probenaufbereitung

Das "Clean up" der Proben wurde in den Grundzügen von ARNOLD et al. (1984) übernommen und war für den RIA und für den ELISA identisch.

Von dem im Stomacher ca. 5 Min. homogenisierten Probenmaterial (Dotter oder Vollei) wurden 2 g in Reagenzgläser (Typ II) abgewogen und tropfenweise und unter ständigem Schütteln auf dem Reagenzglasschüttler mit 3 ml Acetonitril versetzt. Nach 15-minütigem Zentrifugieren konnte der Überstand (Rohextrakt) dekantiert und abgewogen werden.

10% des Rohextraktes (der Rest wurde für spätere Untersuchungen bei -20°C eingefroren) wurden auf eine Vorlage von 1 ml aqua dest. pipettiert und anschließend 2mal mit n-Hexan entfettet. Dazu wurden mit Hilfe eines Kippautomaten 3 ml n-Hexan zugegeben, geschüttelt und 5 Min. lang zentrifu-

giert. Die obenliegende Hexan-Phase und die Interphase wurden abgesaugt und verworfen. Nach Wiederholen dieses Arbeitsschrittes wurden zur Extraktion 3 ml Ethylacetat zugegeben, das Gemisch gut geschüttelt und 15 Min. zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgehebert und im Evaporator bei 40°C und mittlerem Schütteln schonend bis zur Trockene eingeengt. Der Trockenrückstand wurde in 0,5 ml PBS-Puffer aufgenommen und je nach CAP-Gehalt in entsprechender Verdünnung wie unter 3.2.1 und 3.2.2 beschrieben, im RIA bzw. ELISA eingesetzt.

3.2.4.2 Untersuchung von künstlich kontaminiertem Dotter und Vollei

Rückstandsfreie Dotter- und Volleiprobe wurden mit 0,5; 1; 2; 5; 10 und 100 ng CAP pro g Probe versetzt. Das nicht mit CAP versetzte Ausgangsmaterial diente als Blindwert (Kontrollwert). Vor und nach CAP-Zugabe wurde das Untersuchungsmaterial 3 Min. im Stomacher homogenisiert und dann, wie unter 3.2.4.1 beschrieben, weiter behandelt.

3.2.4.3 Untersuchung von natürlich kontaminierten Hühnereiern (Dotter/Vollei)

Zur Gewinnung von "gewachsenen" CAP-Rückständen in Eiern wurden an der Lehr- und Versuchsstation für Kleintierzucht in Kitzingen 12 Legehennen der Rasse LSL (Alter 60 Wochen) 5 Tage über das Trinkwasser mit 0,5 g CAP/l (Chloramphenicol 100% Pulver, bela-pharm) behandelt. Die anfallenden Eier wurden nach Tagen sortiert und einmal pro Woche zur Untersuchung übersandt. Aufgrund der Haltungsbedingung war eine Zuordnung der Eier zu den einzelnen Hennen nicht mehr möglich.

Um einer Kontamination mit evtl. vorhandenem CAP-haltigem Stallstaub vorzubeugen, wurden die Eischalen vor dem Auf-

schlagen mit Alkohol gereinigt. Untersucht wurden Dotter und Vollei, wobei jeweils 2 Dotter bzw. 2 Eier zu einer Probe vereinigt wurden.

3.2.5 Untersuchung von Fleisch mittels RIA und ELISA

Die Untersuchungen beschränkten sich auf Muskelfleisch und Nieren von Rindern.

3.2.5.1 Probenaufbereitung

Muskelfleisch und Nieren wurden zunächst grob von Fett und Bindegewebe befreit, und dann in einem haushaltsüblichen Zerkleinerungsgerät mit Rotationsmesser (Moulinette) zu einem möglichst feinen Brei zerhackt. Das Probenhomogenat wurde in Stomacherbeutel abgewogen, mit der adäquaten Menge aqua dest. aufgefüllt und im Stomacher ca. 5 Min. homogenisiert. Von dem Homogenat wurden 4 g in Reagenzgläser (Typ II) abgewogen, und unter ständigem Schütteln auf dem Reagenzglasschüttler, tropfenweise mit 3 ml Acetonitril versetzt. Durch Zentrifugieren (15 Min.) läßt sich der Rohextrakt gewinnen. Die weitere Rohextraktaufbereitung erfolgte nach dem Schema, wie es bei der Eiuntersuchung (3.2.4.1) durchgeführt wurde (s. auch Abb. 11).

3.2.5.2 Untersuchung von künstlich kontaminierten Muskel- und Nierenproben

Muskelfleisch bzw. Nieren vom Rind wurden mit der Moulinette fein zerhackt, und mit 0,5; 1; 2; 5; 10 und 100 ng CAP pro g Probe versetzt. Zur Kontrolle wurde wiederum das Ausgangsprobenmaterial vor CAP-Zugabe als Blindwert mituntersucht.

3.2.5.3 Untersuchung von natürlich belasteten Muskel- und Nierenproben

Um aussagekräftige Untersuchungen durchführen zu können war die Beschaffung einer ausreichenden Anzahl CAP-positiver Proben erforderlich. Dieses Problem konnte mit Unterstützung des Landesuntersuchungsamtes für das Gesundheitswesen Nordbayern in Erlangen gelöst werden, das erwiesenermaßen CAP-positive Nieren- und Muskelproben zur Verfügung stellte. Am Landesuntersuchungsamt wird der vom BGA entwickelte RIA zum CAP-Nachweis eingesetzt. Die Proben, die über einen längeren Zeitraum anfielen, wurden tiefgefroren gelagert, und nach Übersendung nach 3.2.5.1 aufgearbeitet (s. auch Abb 11).

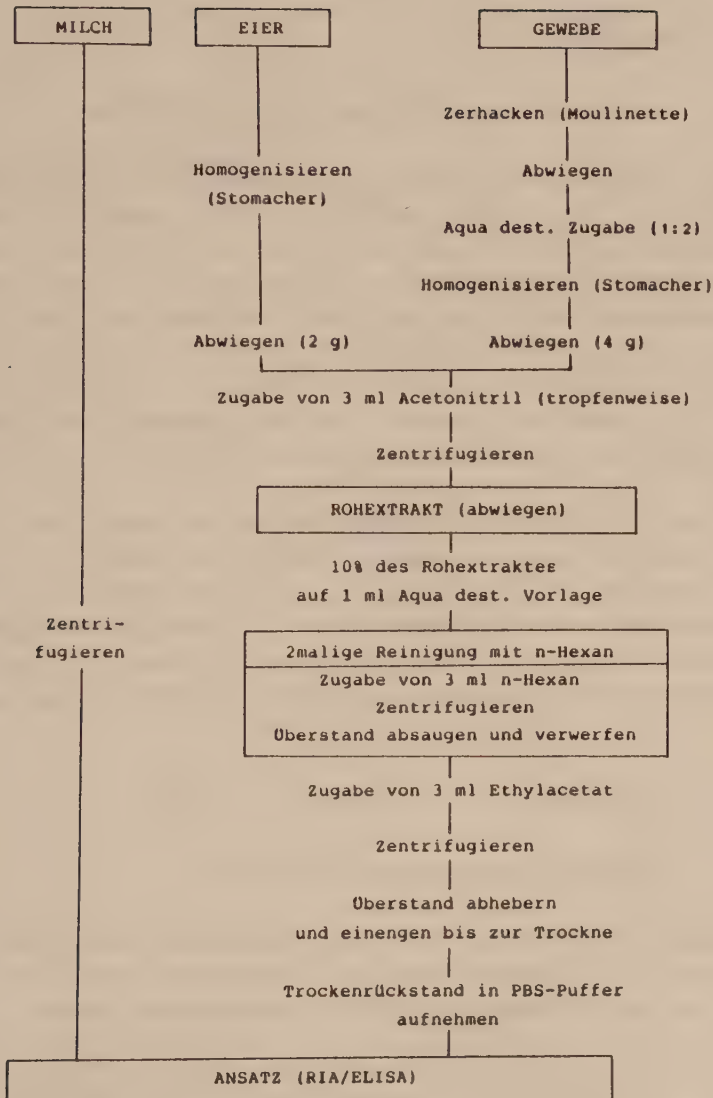


Abb. 11: Arbeitsschema für die Probenaufbereitung von Milch, Eiern und eßbarem Gewebe

3.3 Ergebnisse

3.3.1 Vergleich der Eichkurven von RIA und ELISA

In Abb. 12 sind zwei für RIA bzw. ELISA typische Eichkurven dargestellt. Die größte Genauigkeit zur Quantifizierung unbekannter Proben wird jeweils im annähernd linear verlaufenden steilsten Bereich der Kurven erreicht. Der optimale Meßbereich der RIA-Kurve liegt zwischen 300 und 1 000 pg/ml, während der der ELISA-Kurve um den Faktor 2 bis 3 nach links verschoben ist und zwischen 100 und 500 pg/ml liegt. Die methodisch bedingte Nachweisgrenze liegt somit für den RIA bei 0,2-0,3 ng und für den ELISA bei 0,05-0,1 ng/ml.

Über einen Zeitraum von 2 Monaten wurden zur Ermittlung von Stabilität und Reproduzierbarkeit der beiden Testsysteme 28 aufeinanderfolgende RIA-Kurven und 50 aufeinanderfolgende ELISA-Kurven statistisch ausgewertet. Es wurden Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten der jeweils entsprechenden CAP-Standardwerte ermittelt (Tab. 7 und 8).

3.3.2 Vergleichende Untersuchungen an Milch

3.3.2.1 Bestimmung der Wiederfindungsraten

Milch kann abgesehen von einer Grobentfettung durch Zentrifugieren, auf die im Übrigen auch verzichtet werden kann, vor allem dann, wenn hohe CAP-Gehalte vermutet werden und die Milch stark verdünnt werden muß, ohne weitere Aufbereitung direkt im RIA und ELISA eingesetzt werden. Dadurch vermeidet man Extraktionsverluste und erzielt hohe Wiederfindungsraten. Im ELISA wurden bei CAP-Gehalten zwischen 0,5 und 100 ppb im Mittel 98,60% und im RIA 93,75% mit einem Schwankungsbereich von 10-15% wiedergefunden (Tab. 9).

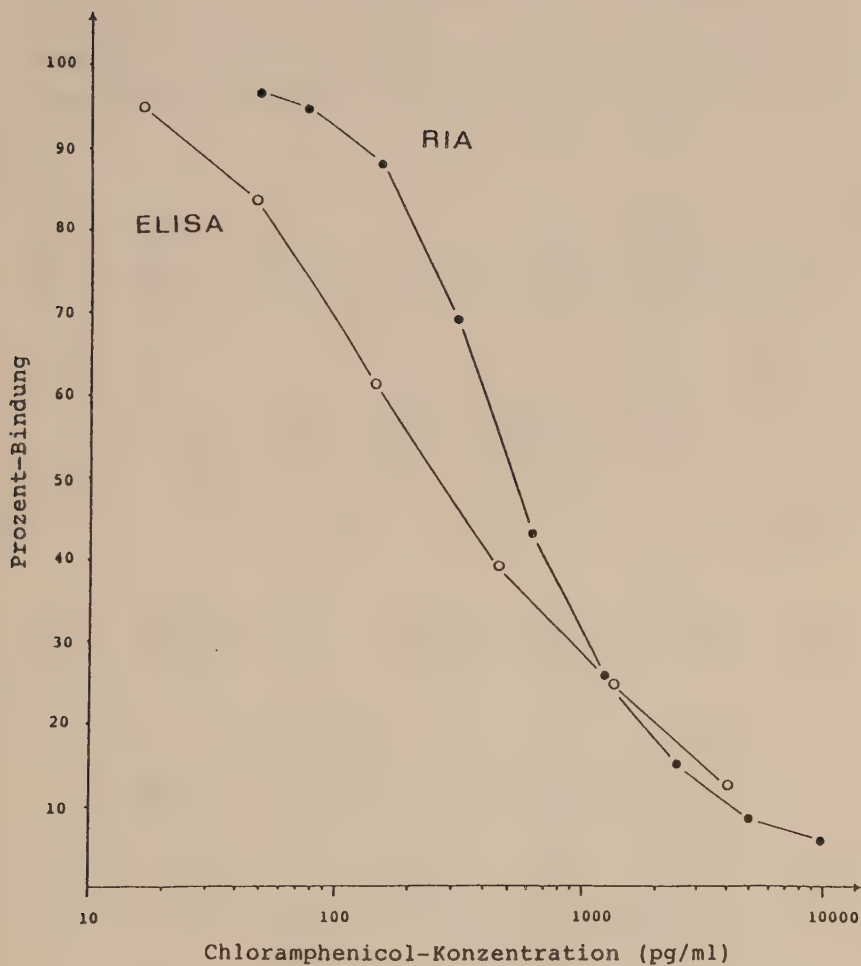


Abb. 12: Vergleich der Eichkurven zur Bestimmung von CAP
mittels RIA (●) und ELISA (○)

Tab. 7: Statistische Auswertung von 28 RIA-Eichkurven

Nummer	Standard- dosis (pg/ml)	%-Bindung (Mittelwert) $\bar{x}$	Standard- abweichung s	Variations- koeffizient VK (%)	Stichproben- umfang n
1	10000,00	95,08	2,39	2,52	28
2	5000,00	93,51	4,13	4,44	28
3	2500,00	83,56	5,86	7,01	28
4	1250,00	65,18	4,36	6,69	28
5	625,00	40,99	2,99	7,31	28
6	312,50	25,09	2,05	8,19	28
7	125,25	14,90	1,18	7,97	28
8	78,12	9,17	0,83	9,10	28
9	50,00	6,07	0,66	10,89	28

Tab. 8: Statistische Auswertung von 50 ELISA-Eichkurven

Nummer	Standard- dosis (pg/ml)	%-Bindung (Mittelwert) $\bar{x}$	Standard- abweichung s	Variations- koeffizient VK (%)	Stichproben- umfang n
1	4000,00	94,48	2,54	2,69	50
2	1333,33	85,70	3,87	4,52	50
3	444,44	63,94	4,74	7,41	50
4	148,15	41,81	4,06	9,71	50
5	49,38	26,95	2,89	10,73	50
6	16,46	15,81	2,13	13,48	50

Mit beiden Methoden sind falsch-positive Ergebnisse ausgeschlossen, CAP-negative Proben lassen sich sehr gut abgrenzen. Die mit Kontrollmilch ermittelten Blindwerte lagen immer unter 0,05 ppb.

Tab. 9: Wiederfindungsraten bei der CAP-Bestimmung (RIA/ELISA) in Rohmilch

	CAP ng/ml (ppb)	Wieder- findung $\bar{x}$ (%)	Standard- abweichung s	Variations- koeffizient VK (%)	Proben- umfang n
RIA	0,5	85,90	5,81	6,76	10
	1,0	93,43	2,00	2,10	10
	2,0	100,19	3,58	3,57	10
	5,0	91,87	1,78	1,94	10
	10,0	97,66	6,75	6,91	10
	100,0	92,99	6,53	7,03	10
ELISA	0,5	96,54	4,15	4,29	10
	1,0	99,03	7,51	7,59	10
	2,0	101,45	6,99	6,89	10
	5,0	97,03	6,15	6,34	10
	10,0	100,24	6,98	6,96	10
	100,0	97,20	5,90	6,07	10

3.3.2.2 Untersuchung von natürlich kontaminierter Milch

Die Anwendbarkeit beider Testsysteme unter Praxisbedingungen konnte im Verlauf eines Ausscheidungsversuchs untersucht werden. Erwartungsgemäß wurde die höchste CAP-Konzentration in der Milch, nach einmaliger CAP-Gabe, im ersten Gemelk, ca. 8 Std. p. inj. gemessen. Sie lag bei beiden Untersuchungsverfahren über 1 ppm. In den folgenden Gemelken nahm die CAP-Konzentration exponentiell ab. Bis einschließlich vierten Tag wurden Werte gemessen, die über der gesetzlichen Höchstmenge von 1 ppb lagen. Die weitere Ausscheidung verlief sehr langsam, so daß noch am 23. Tag die Milch der behandelten Kuh eindeutig von CAP-freier Kontrollmilch unterschieden werden konnte.

Beide Untersuchungsmethoden lieferten Meßwerte, die nur gering voneinander abweichen (Tab 10, Spalte 1 und 2), und sehr gut miteinander korrelieren (Abb. 13). Mit den Daten aus Tab. 10 läßt sich die CAP-Ausscheidung graphisch darstellen (Abb. 14).

Zur Überprüfung der eigenen Meßergebnisse wurden stichprobenweise einige Milchproben dem Tiergesundheitsdienst Bayern in Grub übergeben, und dort mit einem schon im Routinebetrieb angewandten, fast identischen CAP-RIA (SCHWARZER et al., 1986) nachuntersucht.

Die gemessenen CAP-Gehalte (Tab. 10, Spalte 3) stimmten sehr gut mit den eigenen Werten überein und lieferten eine ausgezeichnete Korrelation zwischen RIA, ELISA und 'RIA-Grub'.

Korrelationskoeffizienten der Vergleichsuntersuchung

(n=12)	RIA	ELISA	RIA-Grub
RIA	1,00000	-	-
ELISA	0,99979	1,00000	-
RIA-Grub	0,99999	0,99972	1,00000

Tab. 10: CAP-Ausscheidung in der Milch, nach einmaliger
Injektion von 5 g CAP i.m. (M = Morgengemelk,
A = Abendgemelk, * = Injektionszeitpunkt,
- = nicht untersucht)

Tage p. inj.	Meßwerte in ppb (ng/ml)		
	RIA	ELISA	RIA-Grub
* 1 M	0	0	0
A	1060,40	1103,80	1036,00
2 M	76,20	101,80	71,10
A	17,20	21,60	15,50
3 M	3,97	3,95	3,71
A	1,84	1,88	1,80
4 M	1,32	1,22	1,36
A	0,84	1,05	0,77
5 M	0,69	0,82	0,82
A	0,56	0,85	0,75
6 M	0,47	0,63	-
7 M	0,43	0,61	-
8 M	0,46	0,59	-
9 M	0,45	0,58	-
10 M	0,40	0,48	0,47
11 M	0,35	0,54	-
12 M	0,39	0,40	-
13 M	0,38	0,45	-
14 M	0,36	0,39	-
15 M	0,33	0,36	0,54
16 M	0,33	0,37	0,43
17 M	0,28	0,31	-
18 M	0,26	0,26	-
19 M	0,25	0,27	-
20 M	0,24	0,26	-
21 M	0,22	0,24	-
22 M	0,20	0,20	-
23 M	0,17	0,18	-

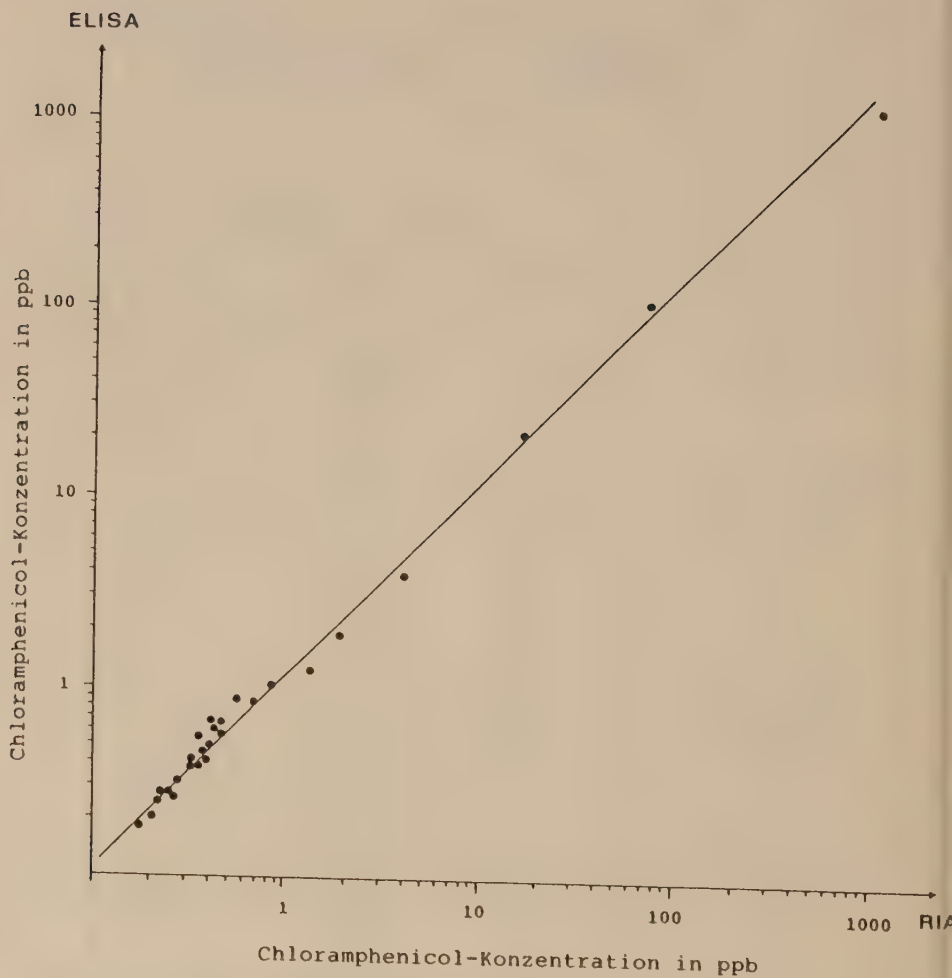


Abb. 13: Korrelation zwischen RIA und ELISA bei der Bestimmung von CAP in Rohmilch

$$n = 27; r = 0,9998; y = 0,986 + 1,041x$$

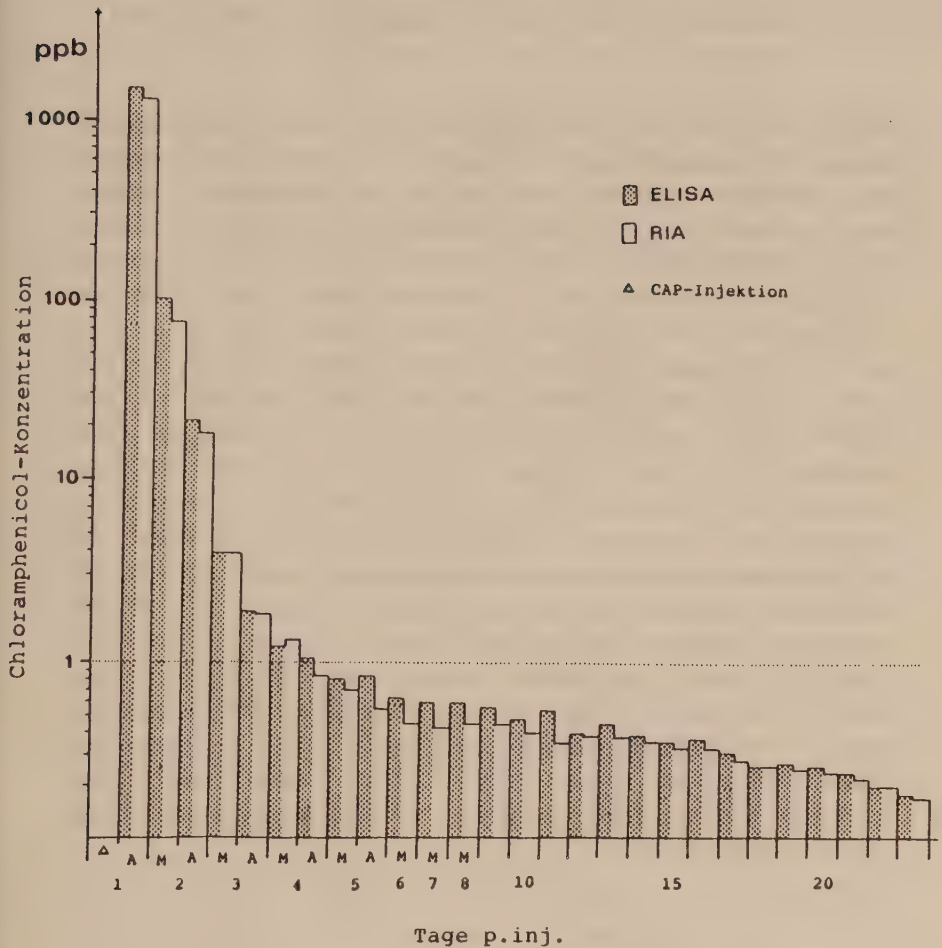


Abb. 14: CAP-Ausscheidung in der Milch nach einmaliger Injektion von 5 g CAP i.m.;
 (A = Abendgemelk, M = Morgengemelk, = gesetzliche Höchstmenge 1 $\mu\text{g/kg}$)

3.3.3 Vergleichende Untersuchungen an Hühnereiern)¹

3.3.3.1 Bestimmung der Wiederfindungsraten in Dotter und Vollei

Die im RIA und im ELISA ermittelten Wiederfindungsraten weichen nur geringfügig voneinander ab. Im Dotter wurden durchschnittlich 88,90% (RIA) und 84,02% (ELISA) der zugegebenen CAP-Gehalte, bei einem Schwankungsbereich von jeweils 10-15%, wiedergefunden. Die Probenblindwerte lagen statistisch normal verteilt im RIA zwischen umgerechnet 0,08 und 0,28 ppb, im ELISA zwischen 0 und 0,17 ppb.

Im Vollei lagen bei gleichem Schwankungsbereich die Wiederfindungsraten geringfügig niedriger bei durchschnittlich 82,47% (RIA) und 79,12% (ELISA). Die Blindwerte lagen zwischen 0,02 und 0,26 ppb (RIA) bzw. 0 und 0,16 ppb (ELISA). Die einzelnen Daten sind den Tabellen 11 und 12 zu entnehmen.

In einer parallel durchgeführten Versuchsreihe wurde bei der Probenaufbereitung auf die 2malige Reinigung des Rohextraktes mit n-Hexan verzichtet. Dadurch konnte die Wiederfindung im Dotter und Vollei um ca. 5% verbessert werden (Tab. 13 und Tab. 14). Dafür mußten ein höherer Schwankungsbereich (15-20%) und höhere Probenblindwerte in Kauf genommen werden (für Dotter: 0,09-0,54 ppb (RIA) bzw. 0,09-0,35 ppb (ELISA); für Vollei: 0,03-0,28 ppb (RIA) bzw. 0,0-0,22 ppb (ELISA)).

)¹ Die bei der Untersuchung von Eiern erzielten Ergebnisse wurden vorgezogen veröffentlicht (BECK et al., 1987)

Tab. 11: Wiederfindungsraten bei der CAP-Bestimmung (RIA/ELISA) im Dotter nach 2maliger Hexan-Entfettung

	CAP ng/g (ppb)	Wieder- findung $\bar{x}$ (%)	Standard- abweichung s	Variations- koeffizient VK(%)	Proben- umfang n
RIA	0,5	98,88	10,29	10,41	10
	1,0	101,13	6,58	6,51	10
	2,0	87,51	5,67	6,48	10
	5,0	80,07	4,84	6,04	10
	10,0	82,87	4,02	4,86	10
	100,0	82,99	6,52	7,86	10
ELISA	0,5	95,80	8,27	8,63	10
	1,0	90,57	4,44	4,91	10
	2,0	81,94	9,25	11,29	10
	5,0	76,29	5,30	6,95	10
	10,0	78,12	6,24	7,99	10
	100,0	81,39	4,99	6,13	10

Tab. 12: Wiederfindungsraten bei der CAP-Bestimmung (RIA/ELISA) im Vollei nach 2maliger Hexan-Entfettung

	CAP ng/g (ppb)	Wieder- findung $\bar{x}$ (%)	Standard- abweichung s	Variations- koeffizient VK(%)	Proben- umfang n
RIA	0,5	96,65	5,45	5,64	10
	1,0	96,97	11,19	11,54	10
	2,0	79,52	4,01	5,04	10
	5,0	71,48	1,52	2,13	10
	10,0	73,25	2,97	4,06	10
	100,0	76,99	5,47	7,10	10
ELISA	0,5	97,40	8,23	8,45	10
	1,0	79,94	8,29	10,37	10
	2,0	75,61	7,56	10,00	10
	5,0	76,73	9,30	12,14	10
	10,0	70,40	2,49	3,50	10
	100,0	74,64	4,84	6,49	10

Tab. 13: Wiederfindungsraten bei der CAP-Bestimmung (RIA/
ELISA) im Dotter ohne Hexan-Entfettung

	CAP ng/g (ppb)	Wieder- findung $\bar{x}$ (%)	Standard- abweichung s	Variations- koeffizient VK(%)	Proben- umfang n
RIA	0,5	113,30	18,37	16,22	10
	1,0	103,27	16,36	15,85	10
	2,0	93,48	5,13	5,49	10
	5,0	76,81	2,52	3,28	10
	10,0	81,37	2,19	2,69	10
	100,0	89,40	4,21	4,71	10
ELISA	0,5	115,58	10,28	8,89	10
	1,0	104,57	13,33	12,76	10
	2,0	87,83	10,47	11,93	10
	5,0	84,16	10,59	12,58	10
	10,0	83,92	9,08	10,81	10
	100,0	85,78	3,92	4,56	10

Tab. 14: Wiederfindungsraten bei der CAP-Bestimmung (RIA/
ELISA) im Vollei ohne Hexan-Entfettung

	CAP ng/g (ppb)	Wieder- findung $\bar{x}$ (%)	Standard- abweichung s	Variations- koeffizient VK(%)	Proben- umfang n
RIA	0,5	92,83	10,00	10,77	10
	1,0	86,07	10,09	11,72	10
	2,0	82,31	8,85	10,75	10
	5,0	75,57	3,92	5,19	10
	10,0	81,60	6,81	8,34	10
	100,0	76,00	4,61	6,06	10
ELISA	0,5	112,96	10,40	9,22	10
	1,0	89,62	6,42	7,24	10
	2,0	83,69	8,78	10,50	10
	5,0	76,59	6,68	8,72	10
	10,0	85,03	12,38	14,56	10
	100,0	76,18	7,60	9,97	10

3.3.3.2 Bestimmung der CAP-Gehalte in natürlich kontaminierten Hühnereiern

Die täglich anfallenden Eier der ersten 4 Wochen nach Behandlungsbeginn wurden auf CAP-Konzentrationen in Dotter und Vollei mittels RIA und ELISA untersucht. Die dabei erhaltenen Meßwerte zeigen gute Übereinstimmung zwischen beiden Untersuchungsmethoden. Sie sind in Tab. 15 dokumentiert und zur Veranschaulichung in Abb. 15 und 16 graphisch dargestellt.

Bereits einen Tag nach Beginn der Arzneimittelverabreichung konnte CAP im Dotter und im Vollei eindeutig nachgewiesen werden. Während der ersten beiden Tage lag die CAP-Konzentration im Dotter noch niedriger als im Vollei. Erst ab dem dritten Tag übertraf sie die Werte für Vollei und erreichte schließlich Werte, die um ein Vielfaches höher waren.

Für beide Untersuchungsmaterialien wurden die höchsten Konzentrationen 6 Tage nach Behandlungsbeginn gemessen (Dotter über 7 ppm; Vollei über 2,5 ppm).

Die vom Gesetzgeber festgelegte Höchstmenge von 1 ppb wurde unter den oben beschriebenen Behandlungsbedingungen im Vollei am 20. Tag und im Dotter am 24. Tag nach Beginn der CAP-Applikation erstmalig unterschritten. Bis zum 28. Tag lagen die Meßwerte im Dotter immer noch im Grenzbereich von 0,001 mg/kg.

Die Übereinstimmung in den Untersuchungsergebnissen von RIA und ELISA wird besonders deutlich bei Bestimmung der Korrelation. Sie wurde mit den Meßwerten aus Tab. 15 berechnet, und in Abb. 17 für Dotter bzw. in Abb. 18 für Vollei wiedergegeben.

Tab. 15: CAP-Ausscheidung im Dotter und Vollei (RIA- und ELISA-Meßwerte) nach 5tägiger Behandlung mit 0,5 g CAP/l Trinkwasser

Tage nach Behandlungs- beginn	Dotter Meßwerte in ppb		Volei Meßwerte in ppb	
	RIA	ELISA	RIA	ELISA
1	45,1	43,8	49,3	57,5
2	232,9	280,0	254,4	306,3
3	1131,1	1176,6	1022,6	1123,2
4	2489,8	2623,8	1320,5	1308,0
5	3077,0	4271,3	2000,0	2121,5
6	7051,0	7702,5	2580,0	2936,3
7	6350,0	6492,9	1762,7	2550,1
8	5097,3	4942,9	1480,2	1293,2
9	3902,7	4277,0	1706,0	1711,0
10	2378,8	2457,6	959,5	847,4
11	2069,5	1985,5	558,2	514,3
12	971,7	859,3	336,2	305,8
13	385,2	347,8	81,3	77,0
14	59,0	74,1	71,0	72,1
15	23,4	30,7	7,3	5,9
16	6,4	9,5	3,5	3,8
17	4,8	8,4	1,6	1,3
18	4,4	6,1	1,1	1,1
19	3,9	5,4	1,2	1,5
20	1,5	2,4	0,6	1,0
21	1,2	2,1	0,5	0,7
22	1,2	1,7	2,0	3,1
23	5,3	8,9	0,7	1,1
24	0,6	0,9	0,2	0,3
25	1,1	1,6	0,3	0,4
26	1,0	1,4		
27	0,9	1,4		
28	0,6	1,2		

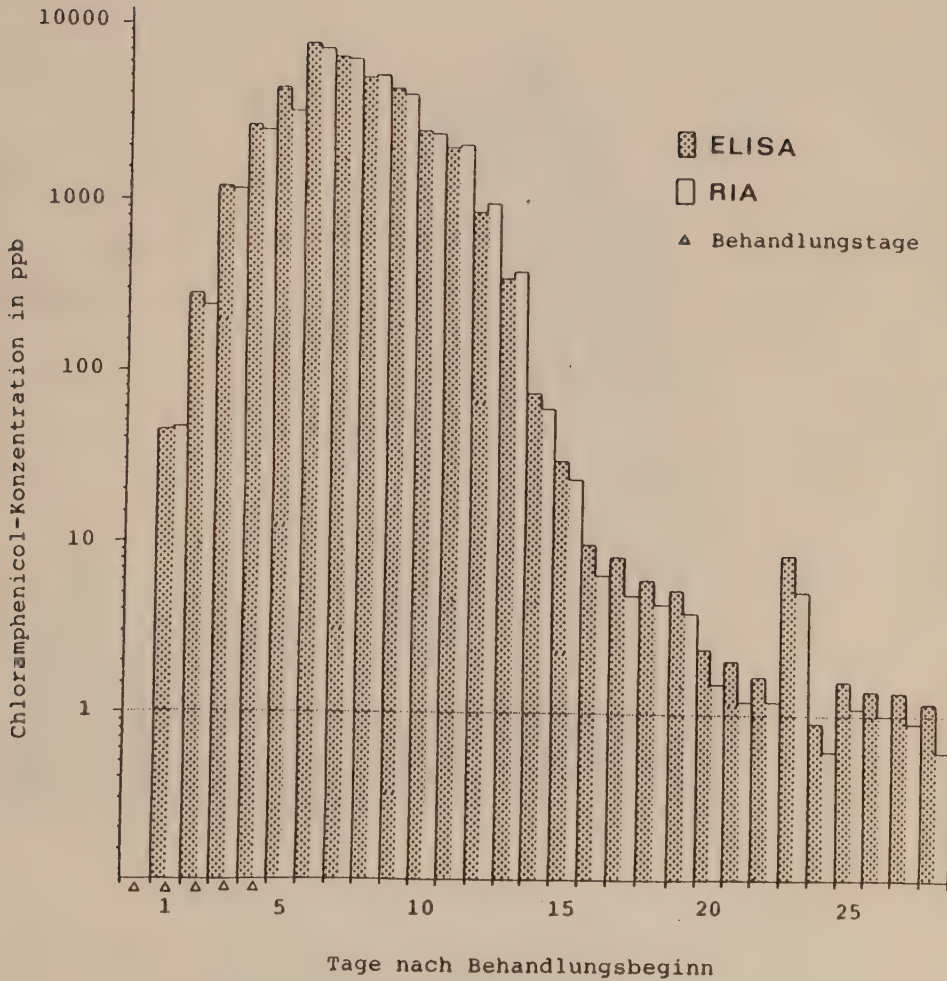


Abb. 15: Verlauf der CAP-Ausscheidung im Dotter nach fünf-tägiger Behandlung mit 0,5 g CAP/l Trinkwasser
(..... = gesetzliche Höchstmenge 1 µg/kg)

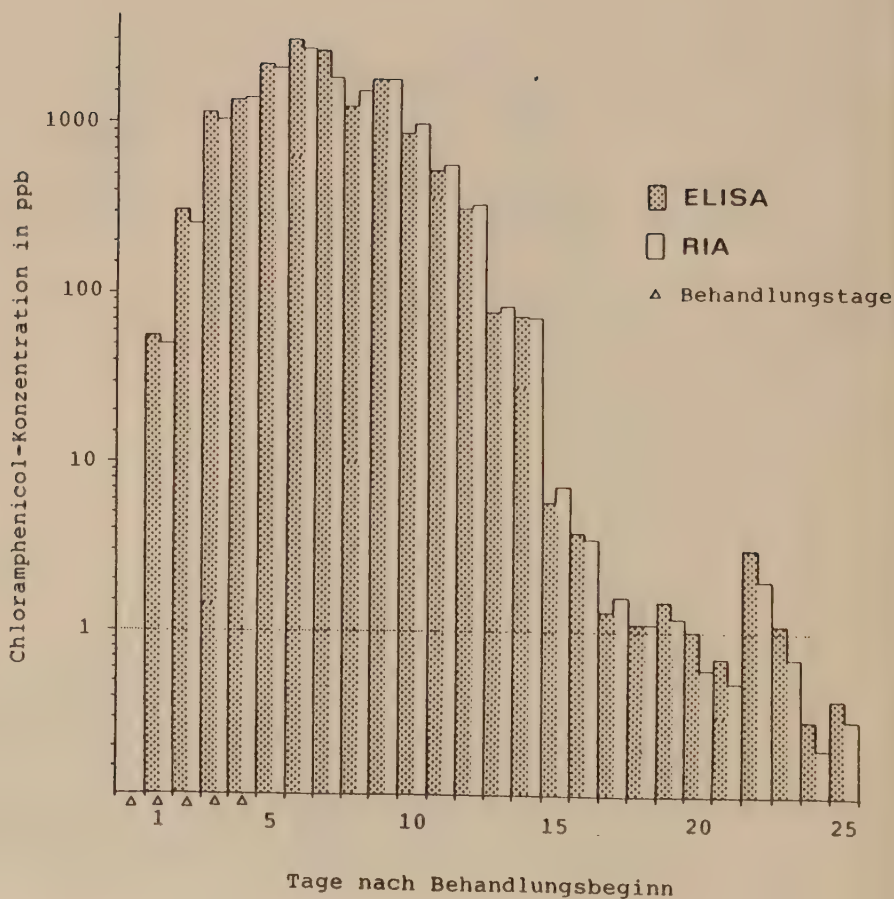


Abb. 16: Verlauf der CAP-Ausscheidung im Vollei nach fünf-
tägiger Behandlung mit 0,5 g CAP/l Trinkwasser
(..... = gesetzliche Höchstmenge 1 µg/kg)

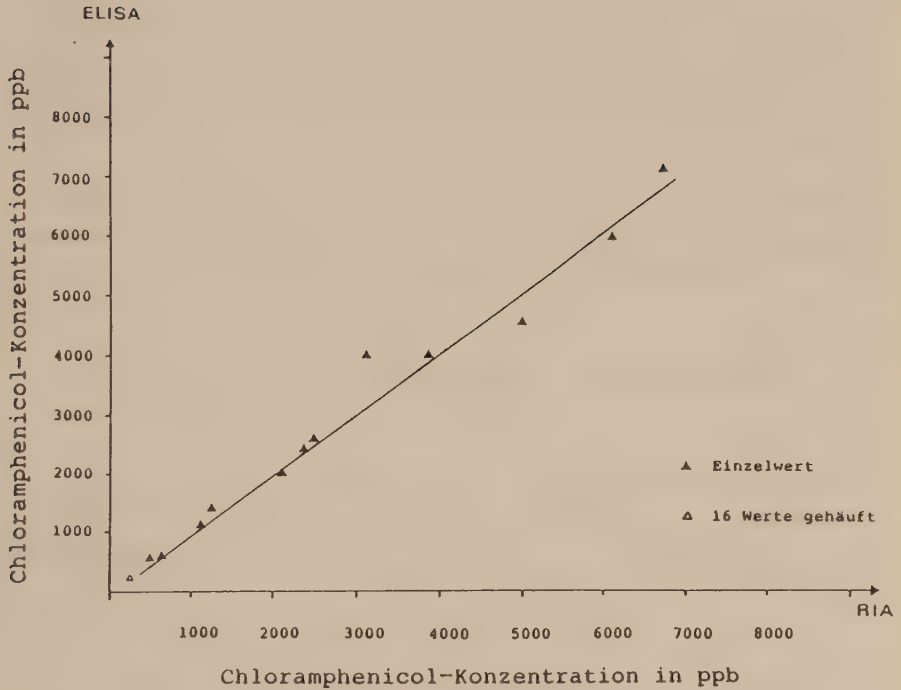


Abb. 17: Korrelation zwischen RIA und ELISA, bei der Bestimmung von CAP im Dotter
 $n = 28$; $r = 0,9945$; $y = 3,627 + 1,063x$

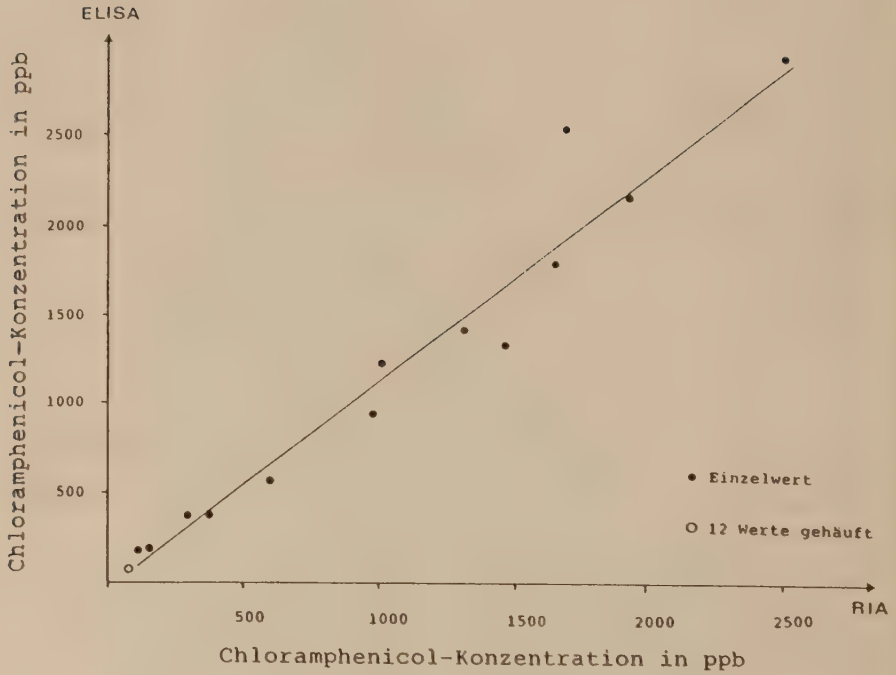


Abb. 18: Korrelation zwischen RIA und ELISA, bei der Bestimmung von CAP im Vollei
 $n = 25$; $r = 0,9841$; $y = -20,596 + 1,109x$

3.3.4 Vergleichende Untersuchungen an Fleisch

3.3.4.1 Bestimmung der Wiederfindungsraten

Durchschnittlich wurden von der zugesetzten CAP-Menge (0,5-100 ppb) 87,03% (RIA) und 87,86% (ELISA) in der Niere, sowie 87,23% (RIA) und 85,90% (ELISA) in der Muskulatur wiedergefunden (Tab. 16 u. 17). Es wurden somit fast gleiche Wiederfindungsraten bei der RIA- und ELISA-Methode ermittelt, mit einem Schwankungsbereich, der für beide Methoden bei ca. 15% lag.

Mit umgerechnet 0,11-0,36 ppb (RIA) und 0-0,31 ppb (ELISA) für Niere und Muskulatur lagen die Probenblindwerte etwas höher als die Blindwerte für Milch, Vollei und Dotter.

3.3.4.2 Bestimmung der CAP-Gehalte in natürlich kontaminiertem Fleisch

In Tab. 18 sind die mittels RIA und ELISA gemessenen CAP-Konzentrationen der vom Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern in Erlangen voruntersuchten und als CAP-positiv erfaßten Nieren- und Muskelproben zusammengefaßt.

Als niedrigste CAP-Gehalte wurden in der Muskulatur 0,7-0,9 ppb und in der Niere 1,2-1,3 ppb ermittelt. Die Höchstkonzentrationen lagen bei 860-870 ppb in der Muskulatur bzw. 8300-8800 ppb in der Niere. Da die Meßwerte von RIA und ELISA nur geringfügig voneinander abweichen, ergibt sich zwischen den beiden Untersuchungsmethoden zwangsläufig eine sehr gute Korrelation (Abb. 19 u. 20). Als Korrelationskoeffizienten wurden bei der Nierenuntersuchung $r=0,9894$ und bei der Untersuchung von Muskelfleisch $r=0,9998$ berechnet.

Tab. 16: Wiederfindungsraten bei der CAP-Bestimmung (RIA/ELISA) im Muskelfleisch

	CAP ng/ml (ppb)	Wieder- findung $\bar{x}$ (%)	Standard- abweichung s	Variations- koeffizient VK(%)	Proben- umfang n
RIA	0,5	109,35	11,72	10,72	6
	1,0	91,90	7,44	8,10	6
	2,0	85,13	5,74	6,75	6
	5,0	79,25	6,51	8,22	6
	10,0	77,68	8,25	10,62	6
	100,0	80,08	8,85	11,06	6
ELISA	0,5	103,43	11,84	11,45	6
	1,0	89,66	5,46	6,09	6
	2,0	82,88	3,65	4,41	6
	5,0	85,08	2,93	3,45	6
	10,0	75,70	3,25	4,29	6
	100,0	78,65	3,14	3,99	6

Tab. 16: Wiederfindungsraten bei der CAP-Bestimmung (RIA/ELISA) in Nieren

	CAP ng/ml (ppb)	Wieder- findung $\bar{x}$ (%)	Standard- abweichung s	Variations- koeffizient VK(%)	Proben- umfang n
RIA	0,5	102,63	15,41	15,02	6
	1,0	91,66	5,84	6,37	6
	2,0	84,35	5,14	6,09	6
	5,0	79,18	6,12	7,73	6
	10,0	81,73	6,05	7,40	6
	100,0	82,60	5,85	7,08	6
ELISA	0,5	105,88	3,90	3,69	6
	1,0	89,95	6,15	6,85	6
	2,0	87,11	4,45	5,10	6
	5,0	82,40	3,85	4,68	6
	10,0	81,16	6,98	8,61	6
	100,0	80,67	6,49	8,04	6

Tab. 18: CAP-Gehalte positiver Muskel- und Nierenproben
 (-) = Probe stand nicht zur Verfügung

Proben- nummer	Meßwerte in ppb (ng/g)			
	Muskulatur		Niere	
	RIA	ELISA	RIA	ELISA
909	270,5	275,6	8291,0	8831,6
1139	(-)	(-)	4,3	4,4
1238	868,9	857,5	31,1	35,3
1490	(-)	(-)	47,5	48,7
1590	(-)	(-)	8,5	9,2
3339	3,5	2,7	18,5	18,8
3747	41,5	41,5	24,2	27,9
3749	5,0	5,2	(-)	(-)
3857	2,4	4,9	(-)	(-)
3911	1,1	1,3	(-)	(-)
5051	18,2	17,9	7,4	7,7
6016	239,9	235,3	3599,5	5399,0
8174	1,1	1,1	8,2	7,4
8993	334,7	312,1	8,6	9,2
11749	19,1	18,0	54,9	47,8
15495	8,1	8,1	1,6	2,1
16053	1,3	1,0	33,0	38,7
16653	5,9	5,9	2,4	2,7
17091	3,6	3,4	2,4	2,6
17152	1,6	1,3	1,8	1,6
17199	3,0	2,6	3,7	3,9
17380	0,9	0,7	1,3	1,2
17995	0,9	0,9	(-)	(-)

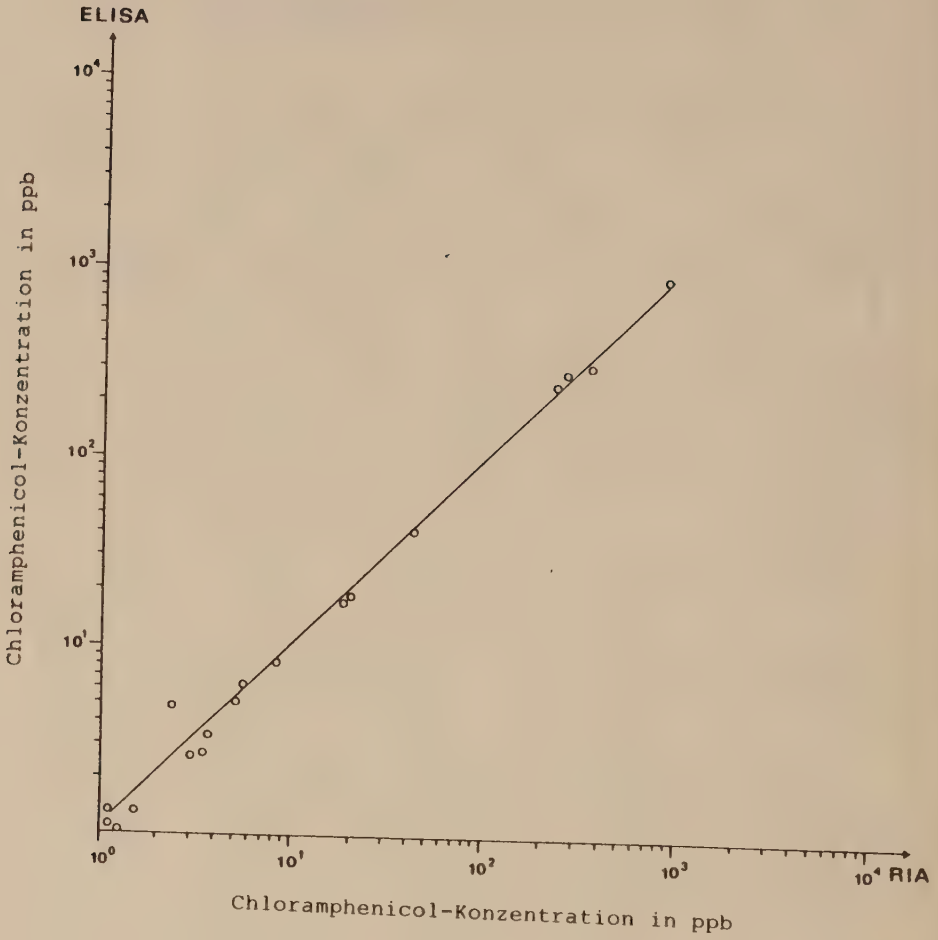


Abb. 19: Korrelation zwischen RIA und ELISA bei der Bestimmung von CAP in Muskelfleisch
 $n = 20$; $r = 0,9998$; $y = -0,1609 + 0,9830x$

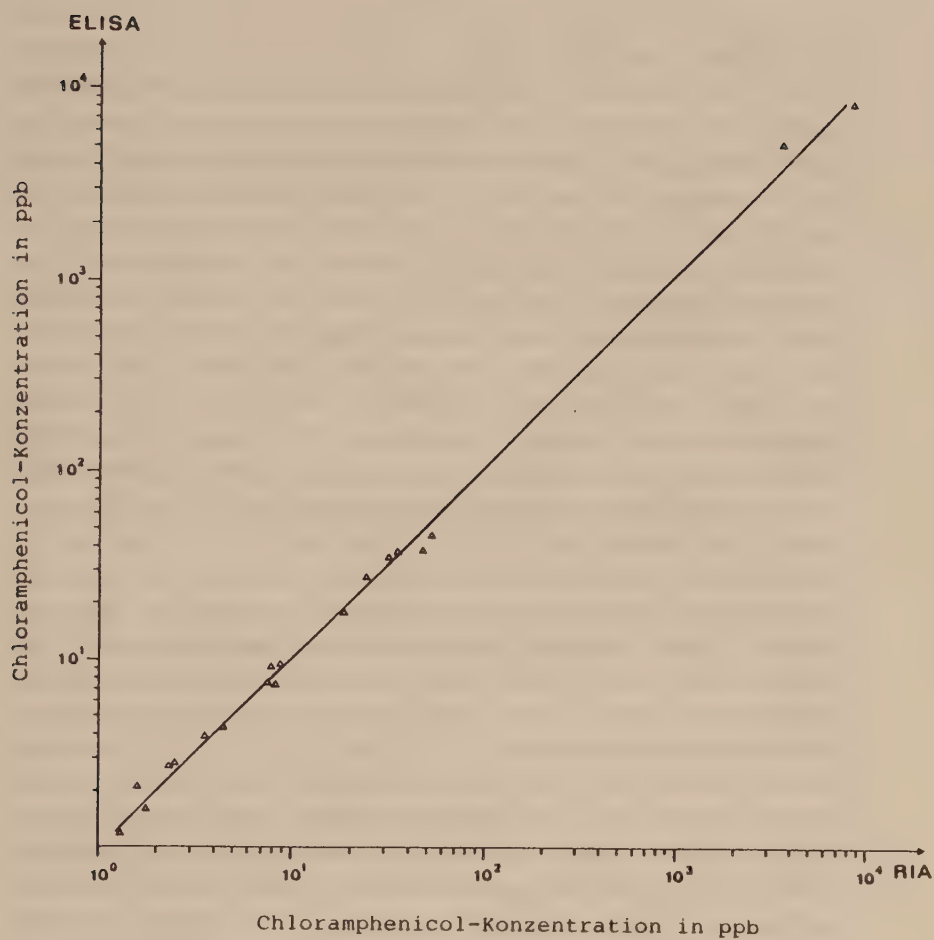


Abb. 20: Korrelation zwischen RIA und ELISA bei der Bestimmung von CAP in Nieren

$$n = 19; r = 0,9894; y = 41,8934 + 1,1279x$$

4 Diskussion

Erhebliche toxikologische Bedenken veranlaßten den Gesetzgeber in der "Dritten Verordnung zur Änderung der Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung" vom 5. April 1984 die Anwendung von CAP bei Tieren, die der Milchgewinnung dienen und bei Geflügel, das der Eigewinnung dient, zu verbieten. Für Eier, Eiprodukte, Milch und Milcherzeugnisse wurde gleichzeitig eine Höchstmenge von 0,001 mg CAP/kg (ppm) erlassen. Die Anwendung von CAP bei Tieren, die der Fleischgewinnung dienen, ist erlaubt, solange die vorgeschriebenen Wartezeiten eingehalten werden. Zur Fleischbeurteilung wurde in der "Verordnung über die hygienischen Anforderungen beim Verkehr mit Fleisch" vom 30. Okt. 1986 für CAP-Rückstände ein Beurteilungswert von 10 ppb festgesetzt.

Eine Kontrollmöglichkeit sowohl des Anwendungsverbots und der bei uns festgelegten Höchstmengen als auch die Überprüfung von importierten landwirtschaftlichen Produkten aus Ländern, in denen es kein Anwendungsverbot und keine Höchstmengenregelung gibt, ist mit geltenden amtlichen Untersuchungsmethoden möglich.

Um die Höchstmenge von 0,001 mg CAP/kg sicher nachweisen zu können, eignen sich radioimmunologische Verfahren (ARNOLD et al., 1984; BOERTZ, 1984; SCHWARZER, 1985; ARNOLD u. SOMOGYI, 1985; JOOS u. BAUM, 1986; SCHERK u. AGTHE, 1986) sowie Kapillar-GC mit ECD (ARNOLD et al., 1984; BOERTZ, 1984; MALISCH u. SANDMEYER, 1984; LÖSCHER et al., 1985; ARNOLD u. SOMOGYI, 1985; BERGNER-LANG u. KÄCHELE, 1985; MALISCH, 1987).

Methoden, die auf chemischer Umsetzung beruhen (CLARENBURG u. RAO, 1977; SCHWARTZ u. McDONOUGH, 1984), mikrobiologische Hemmstofftests (SCHMIDT, 1975; BOGAERTS et al., 1984; SINGER u. KATZ, 1985), DC mit chemischer (N.N., 1983) oder mikrobiologischer Detektion (BOSSUYT et al., 1976) und HPLC mit UV-Detektion (WAL et al., 1980; KUTTER et al., 1982;

BECHEIRAZ et al., 1983; BORIES et al., 1983; N.N., 1983; JOHANNES et al., 1983; PETZ, 1984) scheiden wegen mangelnder Empfindlichkeit aus.

Da bei der GC eine aufwendige Probenaufbereitung mit zusätzlicher Derivatisierung erforderlich ist, erwies sich für Routineuntersuchungen mit großer Probenanzahl bisher der RIA als die geeignetste Methode.

Mit dem CAP-spezifischen ELISA steht nun ein weiteres Nachweisverfahren zur Verfügung, das, wie die vorliegenden vergleichenden Untersuchungen zeigen, dem RIA durchaus ebenbürtig ist.

Bei allen immunologischen Verfahren können testspezifische Fehlerquellen auftreten, die auf unterschiedliche Ursachen zurückzuführen sind. Beispielsweise wird der größte Störeinfluß auf das RIA-Meßsystem durch den Quencheffekt ausgelöst. Obwohl Dotter, Vollei, Muskulatur und Niere eine Reihe von Reinigungsschritten durchlaufen und schließlich der Trockenrückstand in Puffer aufgenommen wird, liegen immer noch störende Quenchsubstanzen vor. Bei Milch, die ohne Aufbereitung eingesetzt wurde, war der Quench entsprechend höher. Durch den Quench wird bei der Messung eine niedrigere Tritiumaktivität, und da die Testanordnung kompetitiv ist, eine höhere CAP-Konzentration in der Probe vorgetäuscht. Dieser Meßfehler kann durch Erstellen der Eichkurve in dem jeweiligen Probenextrakt umgangen werden, da dann für Eichkurve und Probe gleiche Quenches zu erwarten sind. Eleganter und einfacher läßt sich dieses Problem lösen, wenn alle Meßwerte nach Ermittlung der Zähleffektivität (counting efficiency) von CPM auf DPM korrigiert werden. Quantitative Unterschiede in der Menge der Quenchsubstanzen spielen dann eine untergeordnete Rolle, so daß mit einer Eichkurve in Puffer auch die gleichzeitige Auswertung von Proben verschiedenster Herkunft, z.B. Milch und Ei, möglich ist. Eine Eichkurve in Puffer ist zudem konstanter und von Ansatz zu Ansatz reproduzierbarer als eine im Probenextrakt.

Neben diesen Quenchsubstanzen können Salze, Proteine, Lipide und andere Substanzen, die Interaktionen bei der Antigen-Antikörperreaktion hervorrufen können, die Testergebnisse im RIA beeinflussen. Diese störenden Matrixeffekte werden durch die für Ei und Gewebe beschriebene Probenaufbereitung weitgehend beseitigt, und die Muttersubstanz wird durch die Reinigung zusätzlich angereichert. Obwohl Milch ohne Aufbereitung im RIA eingesetzt wurde, konnten keine störenden Matrixeffekte beobachtet werden.

Im ELISA sind methodisch bedingte Meßfehler, wie sie im RIA durch den Quench möglich sind, ausgeschlossen. Zum einen beruht die ELISA-Auswertung auf einer anderen physikalischen Meßtechnik (Photometrie), zum anderen werden vor der Messung, gleichzeitig mit der Trennung von freiem und gebundenem Antigen alle Substanzen, die stören könnten, durch mehrere Waschschrirte entfernt.

Durch die Probenaufbereitung von Ei und Gewebe werden störende Matrixeffekte beseitigt, und können somit auch den ELISA nur wenig beeinflussen. Dadurch ist auch die Probenauswertung mit einer in Puffer erstellten Eichkurve ohne Einschränkung möglich.

Lediglich bei der Untersuchung von Milch sind im ELISA spezielle Testanpassungen erforderlich, damit Milch ohne Aufbereitung gemessen werden kann. Eine Auswertung von Milchproben mit einer in Puffer erstellten Eichkurve, wie es von MÄRTLBAUER und TERPLAN (1987) beschrieben wurde ist zwar möglich, die Ergebnisse sind jedoch genauer, wenn die Eichkurve mit in Milch/Puffer (1:3) gelösten CAP-Standards erstellt wird und zusätzlich das CAP-spezifische Kaninchen-Antiserum ebenfalls mit einem Milch-Puffer-Gemisch (1:3) verdünnt wird. Damit ist gewährleistet, daß in allen Kavitäten der ELISA-Mikrotiterplatten etwa der gleiche Milchan teil und somit die gleiche Menge an potentiell Matrixeffekte verursachenden Substanzen vorhanden ist.

Für vergleichende Betrachtungen war es erforderlich, beide Testsysteme und Testabläufe aufeinander abzustimmen. Durch identische Probenaufbereitung und durch Erstellen der Eichkurven für RIA und ELISA aus ein und derselben CAP-Stammlösung konnte der analytische Fehler niedrig gehalten werden. Vergleicht man beide Antiseren bezüglich ihrer Spezifität, so ist eine weitgehende Übereinstimmung in ihren antigenen Determinanten zu beobachten. Daraus kann abgeleitet werden, daß mit beiden Methoden auch die gleichen Metaboliten als "CAP-Äquivalente" erfaßt werden. Als antigene Determinante kommt für beide Seren die p-Nitrophenyl-1,3-propandiol-Struktur des CAP-Moleküls in Frage (ARNOLD et al., 1984; MÄRTLBAUER u. TERPLAN, 1987).

Die Präzision beider Methoden kann mit Hilfe der Reproduzierbarkeit der Bestimmungen beurteilt und über den Variationskoeffizienten quantifiziert werden. Läßt man die Ergebnisse der Untersuchung von Dotter und Vollei ohne 2malige Extraktreinigung mit n-Hexan außer acht, bei der vermutlich wegen störender Matrixeffekte allgemein höhere Variationskoeffizienten zu verzeichnen waren, lagen die übrigen Variationskoeffizienten bei der Untersuchung "gespikter" Proben mit einer Ausnahme (RIA; bei mit 0,5 ppb CAP "gespikten" Nieren) immer unter 12,2 %. Konstant niedere Variationskoeffizienten (kleiner als 7,6%) wurden mit beiden Methoden bei der Untersuchung von Milch erzielt. Durch den direkten Testeinsatz waren Schwankungen, die sich durch verschiedene Arbeitsschritte bei der Probenaufbereitung ergaben, ausgeschlossen. Die geringfügig höheren Variationskoeffizienten im ELISA können damit erklärt werden, daß die Proben im ELISA stärker verdünnt werden müssen, um sie in der Eichkurve erfassen zu können. Dafür sind umgekehrt die Probenblindwerte im ELISA niedriger.

Die Nachweisgrenze kann sowohl im RIA als auch im ELISA bei allen untersuchten Lebensmitteln mit 0,5 µg CAP/kg angegeben werden. Bei Verlaufsuntersuchungen ist sogar eine Detektion und Quantifizierung bis 0,2 µg CAP/kg möglich. Beide Nachweisverfahren verfügen somit über eine ausreichende Sicher-

heitsspanne zu den gesetzlich vorgegebenen Höchstmengen von 1 ppb (Milch und Ei) bzw. 10 ppb (Fleisch).

Zur Bewertung der Übereinstimmung zwischen den radioimmunologischen und enzymimmunologischen Bestimmungen wurde die Korrelation herangezogen. Als statistische Maßzahl zur Beurteilung der Tendenz und des Grades des Zusammenhangs empfiehlt sich bei zwei unabhängigen, mit Fehlern behafteten Methoden, der "empirische Korrelationskoeffizient". Sämtliche ermittelten Korrelationskoeffizienten (Milch: $r = 0,9998$; Dotter: $r = 0,9945$; Vollei: $r = 0,9841$; Muskulatur: $r = 0,9998$ und Niere: $r = 0,9894$) lagen nahe bei 1 und zeigen eine streng lineare Beziehung an. Die Korrelation kann unter diesen Bedingungen durch eine Gerade dargestellt werden. Für die untersuchten Lebensmittel ergaben sich folgende Regressionsgeraden; Milch: $y = 0,986 + 1,041 x$; Dotter: $y = 3,627 + 1,063 x$; Vollei: $y = -20,596 + 1,109 x$; Muskulatur: $y = -0,161 + 0,983 x$; Niere: $y = 41,893 + 1,128 x$.

Bei der Untersuchung von Milch auf CAP-Rückstände nach einmaliger Behandlung einer Kuh mit 5 g CAP i.m. konnte ein Ausscheidungsverhalten beobachtet werden, das sich nach den Gesetzen der Kinetik 1. Ordnung richtet (Abb. 14).

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen wurden bei einer Nachuntersuchung einzelner Milchproben am Zentralinstitut des Tiergesundheitsdienstes Bayern in Grub bestätigt. Mit 1,1 ppm wurde die höchste CAP-Konzentration im ersten Gemelk p. inj. gemessen. Nach einem raschen Abfall wurde die gesetzliche Höchstmenge von 1 ppb im 7. Gemelk am 4. Tag p. inj. zum ersten Mal unterschritten. Aufgrund der niedrigen Probenblindwerte, die bei beiden Nachweisverfahren konstant bei annähernd Null lagen, konnte die Milch der behandelten Kuh bis zur Beendigung der Untersuchungen am 23. Tag eindeutig von CAP-freier Kontrollmilch unterschieden werden.

Ein früherer, unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführter Ausscheidungsversuch lieferte insgesamt sowohl im ELISA (MÄRTLBAUER u. TERPLAN, 1987) als auch im RIA (eigene unveröffentlichte Ergebnisse) etwas höhere CAP-Gehalte in den einzelnen Gemelken. Die Ausscheidung verlief wesentlich langsamer, erst am 8. Tag wurde die 1 ppb-Höchstmenge unterschritten.

Die biologische Streuung im Ausscheidungsverhalten verschiedener Individuen einer Spezies ergibt sich aus den individuell unterschiedlichen Stoffwechselleistungen, in die bei Kühen die Milchleistung miteinbezogen werden muß. Bei Hochleistungstieren kann eine raschere Ausscheidung, bei kranken Tieren mit verlangsamtem Stoffumsatz eine langsamere Medikamentenausscheidung angenommen werden.

In der Praxis kann man davon ausgehen, daß, wenn CAP trotz Verbot bei einer Milchkuh angewendet wird, im Unterschied zu diesen Untersuchungen, das Medikament höher dosiert und wiederholt verabreicht wird. Dann ist auch mit einer längeren Ausscheidungsdauer und mit wesentlich höheren Konzentrationen in der Milch zu rechnen. ARNOLD und SOMOGYI (1986) stellten bei subcutaner Verabreichung von 30 mg CAP/kg KGW, und Wiederholung der Behandlung nach 12 Std. in der Milch 6-30 ppm als Höchstwerte und bis zu 40 Tage lang CAP-Konzentrationen über 1 ppb fest.

Hinsichtlich des Rückstandsverhalten von CAP in Eiern konnte Übereinstimmend mit Untersuchungen anderer Autoren (PETZ, 1984; JOOS u. BAUM, 1986) festgestellt werden, daß schon einen Tag nach Beginn der Applikation CAP in Eiern nachgewiesen werden kann. Im Gegensatz zu der Annahme des AUSSCHUSSES "Rückstandsprobleme durch Arzneimitteltherapie" der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (1981), daß Rückstände von Arzneimitteln im Weißei frühestens im zweiten gelegten Ei zu erwarten sind, stehen die Meßwerte für Dotter und Vollei des ersten Tages nach Beginn der CAP-Applikation. Aus dem höheren Volleiwert gegenüber dem Dotterwert muß geschlossen werden, daß CAP schon am ersten Tag auch ins Weißei übergeht.

Der CAP-Gehalt in Dotter und Vollei steigt infolge der weiteren CAP-Verabreichung steil an, bis schließlich am sechsten Tag nach Medikationsbeginn bzw. zwei Tage nach Absetzen die höchsten Konzentrationen erreicht werden. Die gemessenen Höchstwerte stimmen mit anderen Untersuchungen aus neuerer Zeit überein. ARNOLD u. SOMOGYI (1986) stellten bei zehntägiger Verabreichung über das Trinkwasser (400 mg/l) im Dotter bis zu 10 mg/kg fest. JOOS und BAUM (1986) untersuchten Vollei und fanden 2-3 mg/kg (CAP-Gabe 500 mg/kg Futter, neun Tage lang).

Dagegen konnte das von PETZ (1984) beschriebene Plateau in der Ausscheidungskurve, bei dem trotz weiterer CAP-Verabreichungen (400 mg/kg Futter, 14 Tage lang) ab dem 8. Tag keine höheren Konzentrationen mehr im Ei gemessen wurden, vermutlich wegen des kürzeren Behandlungsintervalls nicht beobachtet werden.

Der Rückgang der CAP-Gehalte in Vollei und Dotter verläuft annähernd exponentiell, wobei die Ausscheidung im Dotter wesentlich langsamer abläuft als im Vollei. ARNOLD und SOMOGYI (1986) fanden bei behandelten Hennen noch nach 70 Tagen CAP im Dotter.

Plötzliche und unerwartete Anstiege in den Ausscheidungsdiagrammen (Abb. 15 und 16) können mit individuellen Schwankungen erklärt werden, die hier stärker zum Tragen kommen, da nur zwei Eier, zufällig aus dem Tagesgelege ausgewählt, zu einer Poolprobe vereint wurden.

Die Bedeutung der CAP-Rückstandsanalytik in der Schlacht-tier- und Fleischuntersuchung wird aus Publikationen von BOERTZ et al. (1985), LÖSCHER et al. (1985) sowie AGTHE und SCHERK (1986) ersichtlich. Bei speziellen Untersuchungen wurde in 6,5% (AGTHE u. SCHERK, 1986) bzw. 15% (LÖSCHER et al., 1985) der Muskelproben von Schlachttieren, die nach § 27 AB.A einer bakteriologischen Untersuchung unterzogen wurden, unter anderem CAP nachgewiesen.

Der wichtigste Faktor bei der Untersuchung von eßbarem Gewebe auf CAP-Rückstände dürfte die möglichst feine und homo-

gene Zubereitung der Proben sein, so daß auch tiefer im Gewebe liegendes CAP für die Extraktion zugänglich wird. Zu diesem Zweck wurden Muskelfleisch und Niere erst mit einer Moulinette fein zerhackt und nach Zugabe von aqua dest. (1:2) im Stomacher homogenisiert. Die Extraktion erfolgte in zwei Schritten, erst mit Acetonitril und dann mit Ethylacetat.

Am Landesuntersuchungsamt für das Gesundheitswesen Nordbayern in Erlangen, das die CAP-haltigen Fleisch- und Nierenproben zur Verfügung stellte, wurden die Proben mit einer weniger aufwendigen Aufbereitung untersucht. Das Untersuchungsmaterial wurde dort nur in einer Moulinette zerkleinert und mit Ethylacetat extrahiert, bevor der Extrakt eingedampft wurde.

Damit lassen sich die zum Teil wesentlich höheren CAP-Gehalte bei der Nachuntersuchung erklären. Zur Diskussion steht auch bei gefrorenen Proben eine CAP-Anreicherung nach dem Auftauen im Tausaft.

Besonders auffällig war die Diskrepanz bei Proben mit hohen CAP-Konzentrationen, die bei der Nachuntersuchung bis zu 10 mal höhere CAP-Werte lieferten, als sie vom Landesuntersuchungsamt angegeben wurden. In Proben mit niedrigem CAP-Gehalt lagen die eigenen RIA- und ELISA-Werte maximal um das zwei- bis dreifache über den vorher ermittelten Werten.

Trotz der Unterschiede in den ermittelten CAP-Konzentrationen zwischen den eigenen Untersuchungen und den Untersuchungen am Landesuntersuchungsamt war insgesamt die Korrelation der drei Bestimmungen (RIA, ELISA und 'RIA-Erlangen') gut. Die Korrelationskoeffizienten lagen zwischen 0,89402 und 0,99975.

Zieht man die in der FlHV angegebene Höchstmenge von 10 ppb zur Bewertung der Proben heran, so lagen von den 20 untersuchten Muskelproben 7 (bei der Voruntersuchung waren es 6) und von den 19 Nierenproben 8 (bei der Voruntersuchung nur 2) über dieser Konzentration.

Aus den Muskel- und Nierenproben, die zur Verfügung standen konnten keine Gesetzmäßigkeiten über Zusammenhänge in der CAP-Konzentration von Muskulatur und Niere eines Schlacht-tieres abgeleitet werden. Beispielsweise wurden sowohl hohe Muskelwerte bei vergleichsweise niedrigen Nierenwerten als auch umgekehrt niedere Muskelwerte bei hohen Nierenwerten gemessen.

Mehrere Faktoren können zur Erklärung herangezogen werden. Von Bedeutung ist die Probenentnahmestelle. An der Injektionsstelle werden erfahrungsgemäß die höchsten Arzneimittelkonzentrationen gefunden. Von Einfluß ist auch der Zeitpunkt der Probennahme. Innerhalb von 24-36 Std. p. inj. sind aufgrund der vorwiegend renalen Ausscheidung Höchstwerte in der Niere zu erwarten. Ob Unterschiede im CAP-Gehalt von Nierenmark und Nierenrinde bestehen, bedarf der zusätzlichen Klärung. Wegen der besonderen CAP-Ausscheidung, 10-15% werden als unverändertes CAP glomerulär filtriert (die Glomeruli liegen hauptsächlich in der Rinde), 85-90% werden als CAP-Glucuronid tubulär sekretiert (die Tubuli liegen vorzugsweise im Mark), sind unterschiedliche Resultate denkbar.

Durch den Einsatz des Enzyms β -Glucuronidase könnte auch zu CAP-Glucuronid metabolisiertes CAP, dessen Anteil in Niere und im Harn besonders hoch ist, erfaßt werden (PLATE, 1983).

RIA und ELISA sind hervorragend geeignet, um CAP sicher und zuverlässig in Milch, Eiern und eßbarem Gewebe nachzuweisen. Die Empfindlichkeit, die dabei erreicht wird ist mehr als ausreichend, um die rechtlichen Normen zu erfüllen. Durch die hohe Empfindlichkeit beider Testsysteme genügen kleine Probenäquivalente und entsprechend geringe Mengen organischer Lösungsmittel zu deren Aufarbeitung. Beide Verfahren erlauben einen hohen Probendurchsatz. Von einer geübten Laborkraft können 20-25 Ei- oder Gewebeproben bzw. 50-60 Milchproben pro Tag untersucht werden. Die limitierenden Faktoren sind Probenaufbereitung und Gerätekapazitäten (Zen-

trifuge etc.). Vereinfachungen in der Probenaufbereitung, wie sie bei der Untersuchung von Dotter und Vollei unter Verzicht auf die 2malige Reinigung der Probenextrakte mit n-Hexan angedeutet wurden, bringen Zeit- und Materialersparnis, bei nur geringfügig höherem Schwankungsbereich.

Durch Verkürzen der Inkubation auf 4 Stunden (bei Raumtemperatur) sind bei beiden Testmethoden raschere Resultate zu erzielen. Allerdings ist dann nur eine semiquantitative Aussage ("CAP-positiv", "CAP-negativ" oder "zweifelhaft") möglich.

Für Untersuchungsstellen, die zur Durchführung des RIA nicht eingerichtet sind, bietet sich der ELISA als eine frei von zusätzlichen Auflagen (Sicherheitsvorkehrungen, Abfallbeseitigung etc.) und kostengünstigere Alternative an.

5 Zusammenfassung

Mit dem RIA und dem ELISA wurden zwei serologische Nachweisverfahren zur Bestimmung von CAP in künstlich und natürlich kontaminierten Lebensmitteln tierischen Ursprungs (Milch, Eier und Fleisch) angewendet und verglichen. Beide Methoden eignen sich hervorragend für den routinemäßigen Einsatz und ermöglichen den sicheren CAP-Nachweis bis zu einer Konzentration von $0,5 \mu\text{g/kg}$ in den genannten Lebensmitteln.

Die in künstlich kontaminiertem Untersuchungsmaterial ermittelten Wiederfindungsraten hängen weitgehend von Art und Umfang der Probenaufbereitung ab. Die Wiederfindungsraten liegen durchschnittlich bei 90% in Milch und 80% in Dotter, Vollei, Muskelfleisch und Niere. Die ELISA-Meßwerte stimmen dabei sehr gut mit den RIA-Werten überein.

Natürlich kontaminiertes Untersuchungsmaterial wurde im Verlauf zweier Ausscheidungsversuche gewonnen: Zum einen wurden einer Milchkuh 5 g CAP i.m. verabreicht und bis zum 23. Tag danach die Milch auf CAP-Rückstände untersucht. Zum anderen wurden 12 Legehennen 5 Tage lang über das Trinkwasser mit $0,5 \text{ g CAP/l}$ behandelt und die Eier der Tiere über vier Wochen auf Rückstände dieses Arzneimittels untersucht.

Unter den gegebenen Bedingungen wurden die höchsten CAP-Konzentrationen in der Milch ($1,1 \text{ mg/kg}$) im ersten Gemelk ca. 8 Std. p. inj., im Dotter ($7-8 \text{ mg/kg}$) und Vollei ($2-3 \text{ mg/kg}$) am 6. Tag nach Beginn der Medikamentengabe gemessen.

Die gesetzliche Höchstmenge von $1 \mu\text{g/kg}$ wurde in der Milch am 4. Tag p. inj., im Dotter am 24. bzw. im Vollei am 20. Tag nach Medikationsbeginn zum ersten Mal unterschritten.

Für die Untersuchung von natürlich kontaminiertem Fleisch konnte auf CAP-belastete Muskel- und Nierenproben von Schlachttieren, die bereits mit einem vergleichbaren RIA voruntersucht waren, zurückgegriffen werden.

Mit den Ergebnissen aus der Untersuchung des natürlich kontaminierten Untersuchungsmaterials wurde die Korrelation der

RIA- und ELISA-Meßwerte bestimmt. Es ergab sich eine streng lineare Beziehung zwischen RIA und ELISA. Die Korrelationskoeffizienten, die für Milch, Dotter, Vollei, Muskulatur und Niere berechnet wurden, lagen alle sehr nahe bei 1.

Mit dem CAP-ELISA steht ein Verfahren zur Verfügung, das bei erwiesenermaßen gleicher Zuverlässigkeit und Leistungsfähigkeit auch in Labors eingesetzt werden kann, die nicht für den RIA ausgestattet sind.

6 Summary

Analysis of chloramphenicol residues in milk, hen's eggs and meat: A comparison of a radioimmunoassay (RIA) and an enzym-immunological assay (ELISA)

For the detection of chloramphenicol (CAP) in artificially and naturally contaminated food of animal origin (milk, hen's eggs and meat), two serological research methods (RIA and ELISA) were applied and compared. Both methods are excellent suited for routine examination and permits a reliable indication of CAP in the above mentioned products down to concentrations of 0,5 µg/kg.

The recovery rates, determined in artificially contaminated specimens depend on the mode and extent of the clean up procedures.

The average recoveries are in the order of 90% in milk and of 80% in yolk, whole egg, muscle and kidney respectively. The test results of RIA and ELISA are in a very good agreement.

Naturally contaminated specimens were obtained during two secretion experiments: A cow obtained a single intramuscular treatment of 5 g CAP; the milk was examined over a 23 day period after the injection. To twelve hens water, containing 0,5 g CAP/l was administered over a 5 day period. The eggs were examined during the following 4 weeks for CAP residues.

Under the mentioned conditions the highest concentrations of CAP were determined in the first milk sample (1,1 mg/kg) taken approximately 8 hours after injection, in yolk (7-8 mg/kg) and whole egg (2-3 mg/kg) on the sixth day after the beginning of the experiment.

The results indicate that on the fourth day after the injection the CAP concentrations in milk fell for the first time below the value limited by law. This limit was reached after 24 days in yolks and 20 days in whole eggs, respectively, after the start of the treatment.

For the detection of CAP in naturally contaminated meat samples from slaughtered animals (muscle and kidney), examined already with a comparable RIA, were available.

The results of the naturally contaminated specimens on CAP revealed a good correlation between RIA and ELISA. The relationship is strictly linear and the calculated correlation coefficients for milk, yolk, whole egg, muscle and kidney are nearly 1.

With the CAP-ELISA an assay with at least the same reliability and performance is available for laboratories which are not equipped for RIA.

7 Literatur

ACHARAYA, R.K. und S.D.S. GOWDA (1979):

The structure of chloramphenicol

Acta Chryst. B 35, 1360-1363

AGTHE, O. und F. SCHERK (1986):

Rückstände von Chloramphenicol in der Muskulatur von
Schlachttieren aus dem Raum Weser-Ems

Arch. Lebensmittelhyg. 37, 97-99

ALLEN, E.H. (1985):

Review of chromatographic methods for chloramphenicol
residues in milk, eggs and tissues from food-producing
animals

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68, 990-999

ALLIN, K. (1976):

Chemische Bestimmung von Breitband-Antibiotika in
Lebensmitteln tierischer Herkunft

Diss. rer. nat., Berlin TU

ARNOLD, D. (1985):

Arbeitsanleitung zur Durchführung des CAP-RIA

BGA, Berlin

ARNOLD, D. und A. SOMOGYI (1985):

Trace analysis of chloramphenicol residues in eggs,
milk, and meat: comparison of gas chromatography and
radioimmunoassay

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68, 984-990

ARNOLD, D. und A. SOMOGYI (1986):

Chloramphenicol residues in edible tissues of food
animals

Proceedings 2nd World Congress Foodborne Infections
and Intoxications, Berlin, Mai 1986

ARNOLD, D., D.vom BERG, A.K. BOERTZ, U. MALLICK und
A. SOMOGYI (1984):

Radioimmunologische Bestimmung von Chloramphenicol-
Rückständen in Muskulatur, Milch und Eiern
Arch. Lebensmittelhyg. 35, 131-136

ARZNEIMITTELKOMMISSION (1970):

Zur Therapie mit Chloramphenicol (Zweiter Warnhinweis)
Dtsch. Ärzteblatt 67, 71-72

AUSSCHUSS "Rückstandsprobleme durch Arzneimittel-
therapie" der Deutschen Veterinärmedizinischen
Gesellschaft (1981):

Vorschläge der DVG über die Verwendung von Arznei-
mitteln bei Legehennen im Hinblick auf die Bildung
von Rückständen im Lebensmittel Ei
Dtsch. Tierärzteblatt 29, 480-489

AZADEGAN, A., D.W. JOHNSON und C.M. STONE (1980):

Influence of time interval between administration of
chloramphenicol and thiamylal on the sleeping time of
mice

Am. J. Vet. Res. 41, 976-977

de BACKER, P. und M. DEBACKERE (1979):

Comparative study of chloramphenicol absorption in
calves after oral, intra-ruminal and intra-abomasal
administration

J. Vet. Pharmacol. Therap. 2, 195-202

BAGGOT, J.D. (1978):

Some aspects of clinical pharmacokinetics in
veterinary medicine. I.

J. Vet. Pharmacol. Therap. 1, 5-18

BARTZ, Q.R. (1948):

Isolation and characterization of chloromycetin
J. Biol. Chem. 172, 445-450

BECHEIRAZ, M., A. HALDEMANN und R. ETTER (1983):

Bestimmung von Chloramphenicol in tierischen Lebens-
mitteln

Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg. 74, 147-155

BECK, E.A. (1975):

Chloramphenicol- und Thiamphenicol-schäden des Blutes
Schweiz. med. Wschr. 105, 1078-1080

BECK, M., E. MÄRTLBAUER und G. TERPLAN (1987):

Untersuchung von Eiern auf Chloramphenicol-Rückstände:
Vergleich eines Radioimmunoassays (RIA) mit einem
enzymimmunologischen Verfahren (ELISA)

Arch. Lebensmittelhyg. 38, 99-103

BERGNER-LANG, B. und M. KÄCHELE (1985):

Schnellmethode zur gaschromatographischen Bestimmung
von Chloramphenicol in Milch

Dtsch. Lebensm.-Rdsch. 81, 278-280

BESSMAN, S.P. und S. STEVENS (1950):

A colorimetric method for the determination of
chloramphenicol in serum or plasma

J. Lab. Clin. Med. 35, 129-135

BEST, W.R. (1967):

Chloramphenicol-associated blood dyscrasias

J. Am. Med. Assoc. 201, 181-188

BETINA, V. (1964):

A systematic analysis of antibiotics using paper
chromatography

J. Chromatogr. 15, 379-392

BEYER, K.W., E. BULLING, G. GODGLÜCK und R. STEPHAN (1971):

Die Wirkung der Antibiotikabeifütterung in nutritiven Dosen auf die Resistenzentwicklung der coliformen Darmflora bei Schweinen

Zbl. Vet. Med. B 18, 385-395

BOERTZ, A.K. (1984):

Radioimmunologische und gaschromatographische Untersuchungen zum Rückstandsverhalten von Chloramphenicol beim Schwein

Diss. rer. nat., Berlin TU

BOERTZ, A.K., D. ARNOLD und A. SOMOGGYI (1985):

Das Rückstandsverhalten von Chloramphenicol nach intramuskulärer Applikation beim Schwein

Z. Ernährungswiss. 24, 113-119

BOGAERTS, R., D. de VOS und J.-M. DEGROODT (1984):

Chloramphenicol-Rückstände im Urin von Schlachttieren:

Microbiologischer Screeningtest für den Nachweis Fleischwirtsch. 64, 208-210

BORIES, G.S.F., J.-C. PELERAN und J.-M. WAL (1983):

Liquid chromatographic determination and mass spectrometric confirmation of chloramphenicol residues in animal tissues

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 66, 1521-1526

BOSSUYT, R., R. van RENTERGHEM und G. WAES (1976):

Identification of antibiotic residues in milk by thin-layer chromatography

J. Chromatogr. 124, 37-42

CAMPBELL, G.S., R.P. MAGEAU, B. SCHWAB und R.W. JOHNSTON (1984):

Detection and quantitation of chloramphenicol by competitive enzyme-linked immunoassay
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 25, 205-211

CLARENBURG, R. und V.R. RAO (1977):

A fluorometric method to assay chloramphenicol
Drug Metabolism and Disposition 5, 246-252

COOPER, T.G. (1981):

Biochemische Arbeitsmethoden
Verlag de Gruyter, Berlin, New York

de CORTE-BAETEN, K. und M. DEBACKERE (1975):

Chloramphenicol plasma levels in horse, cattle and sheep after oral and intramuscular administration
Zbl. Vet. Med. A 22, 704-712

de CORTE-BAETEN, K. und M. DEBACKERE (1976):

Ausscheidung von Chloramphenicol in der Milch nach oraler und parenteraler Applikation bei laktierenden Rindern
Dtsch. tierärztl. Wschr. 83, 231-233

de CORTE-BAETEN, K. und M. DEBACKERE (1978):

The non-absorption of chloramphenicol after oral administration in adult ruminants: a tentative explanation from in vitro studies
J. Vet. Pharmacol. Therap. 1, 129-134

DAVIS, L.E., C.A. NEFF, J.D. BAGGOT und T.E. POWERS (1972):

Pharmacokinetics of chloramphenicol in domesticated animals
Am. J. Vet. Res. 33, 2259-2266

DEVANI, M.B., C.J. SHISHOO, K.J. DOSHI und A.K. SHAH (1981):

Spectrophotometric determination of chloramphenicol and its esters in complex drug mixtures

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64, 557-563

DILL, W.A., E.M. THOMPSON, R.A.FISKEN und A.J. GLAZKO (1960):

A new metabolite of chloramphenicol

Nature 185, 535-536

DORN, P., C. SCHWARZER und E. RATTENBERGER (1986):

Verfolgungsuntersuchung zur Kontamination mit

Chloramphenicol in der Broilerproduktion

Dtsch. tierärztl. Wschr. 93, 70-71

DORN, P., R. WEBER, J. WEIKEL und E. WESSLING (1983):

Intoxikation durch gleichzeitige Verabreichung von

Chloramphenicol und Monensin bei Puten

Prakt. Tierarzt 64, 240-243

DORRESTEIN, G.M., H. van GOGH und J.D. RINZEMA (1984):

Pharmacokinetic aspects of penicillins, amino-glycosides and chloramphenicol in birds compared to mammals. A review

Vet. Quart. 6, 216-224

DUMANOVIC, D., J. VOLKE und R. JOVANOVIC (1971):

Simultaneous polarographic determination of p-nitro-2-acetamido-3-hydroxypropionophene and 1-p-nitrophenyl-2-amino-1,3-propanediol

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 54, 884-892

DUNITZ, J.D. (1952):

The crystal structure of chloramphenicol and bromamphenicol

J. Am. Chem. Soc. 74, 995-999

DWENGER, A. (1984):

Radioimmunoassay: An overview

J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 22, 883-894

EHRlich, J., Q.R. BARTZ, R.M. SMITH und D.A. JOSLYN
(1947):

Chloromycetin, a new antibiotic from a soil
actinomycete

Science 106, 417

EHRlich, J., D. GOTTLIEB, P.R. BURKHOLDER,

L.E. ANDERSON und T.G. PRIDHAM (1948):

Streptomyces venezuelae, n. sp., the source of
chloromycetin

J. Bact. 56, 467-477

EL-KERSH, T.A. und J.R. PLOURDE (1976):

Biotransformation of antibiotics.

I. Acetylation of chloramphenicol by spores of
streptomyces griseus isolated from the egyptian soil

J. of Antibiotics 29, 292-302

ENGLISH, P.B. und A.A. SEAWRIGHT (1961):

Plasma and tissue concentrations of chloramphenicol
in the pig

Aust. Vet. J. 37, 9-13

ENGLISH, P.B. und D. WITHY (1959):

Serum, urine and tissue levels of chloramphenicol in
the horse

Aust. Vet. J. 35, 187-193

ERLANGER, B.F., F. BOREK, S.M. BEISER und S. LIEBERMAN
(1957):

Steroid-protein conjugates

I. Preparation and characterization of conjugates of
bovine serum albumin with testosterone and cortisone

J. Biol. Chem. 228, 713-727

FALK, M. und K. ZENGEL (1978):

Untersuchungen zur Zersetzungskinetik von

Chloramphenicol in wäßriger Lösung

Pharmazie 33, 381-382

FORTH, W., D. HENSCHLER und W. RUMMEL (1980):

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie

3. Aufl.

Wissenschaftsverlag, Bibliographisches Institut,

Mannheim, Wien, Zürich

FOSSDAL, K. und E. JACOBSON (1971):

Polarographic determination of chloramphenicol

Anal. Chim. Acta. 56, 105-115

FRAUNFELDER, F.T., G.C. BAGBY und D.J. KELLY (1982):

Fatal aplastic anemia following topical administration

of ophthalmic chloramphenicol

Am. J. Ophthalmol. 93, 356-360

FREEMAN, K.B., H. PATEL und D. HALDAR (1977):

Inhibition of desoxyribonucleic acid synthesis in

Ehrlich ascites cells by chloramphenicol

Mol. Pharmacology 13, 504-511

GAFFNEY, D.F. und T.J. FOSTER (1978):

Chloramphenicol acetyltransferase determined by

R plasmids from gram-negative bacteria

J. Gen. Microbiol. 109, 351-358

GÄRTNER, E. und W. MÜLLER (1976):

Die Antibiotikaresistenz von Micrococcaceae aus der

Stallluft von Schweine- und Geflügelställen

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 89, 112-116

GEDEK, W. (1973):

Ausscheidung von Antibiotika mit der Milch

Tierärztl. Prax. 1, 245-251

GERULL, A. (1981):

Nachweis von Chloramphenicol in Lebensmitteln
tierischer Herkunft

Diss. rer. nat., Berlin TU

GLAZKO, A.J. (1966):

Identification of chloramphenicol metabolites and
some factors affecting metabolic disposition
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 6, 655-665

GLAZKO, A.J., W.A. DILL und M.C. REBSTOCK (1950):

Biochemical studies on chloramphenicol (chloromycetin)
III. Isolation and identification of metabolic
products in urine

J. Biol. Chem. 183, 679-691

GLAZKO, A.J., L.M. WOLF und W.A. DILL (1949a):

Biochemical studies on chloramphenicol (chloromycetin)
I. Colorimetric methods for the determination of
chloramphenicol and related nitro compounds

J. Biol. Chem. 177, 411-418

GLAZKO, A.J., L.M. WOLF und W.A. DILL (1949b):

Biochemical studies on chloramphenicol (chloromycetin)
II. Tissue distribution and excretion studies

J. Pharmacol. Exp. Therap. 96, 445-459

GORZELEWSKA, K. und T. JUSKIEWICZ (1961):

Studies to establish the dosage of "chloromycetin"
(chloramphenicol) for domestic animals by means of
serum and milk level determination

Bull. Inst. Vet. 5, 2-3; zitiert nach DAVIS (1972)

GOTTLIEB, D, P.K. BHATTACHARYYA, H.W. ANDERSON und
H.E. CARTER (1948):

Some properties of an antibiotic obtained from a
spezies of streptomyces

J. Bact. 55, 409-417

GROSS, B.J., R.V. BRANCHFLOWER, T.R. BURKE, D.E. LEES
und L.R. POHL (1982):

Bone marrow toxicity in vitro of chloramphenicol and
its metabolites

Toxicol. and appl. Pharmacol. 64, 557-565

GRUHZIT, O.M., R.A. FISKEN, T.F. REUTNER und
E. MARTINO (1949):

Chloramphenicol (chloromycetin), an antibiotic.
Pharmacological and pathological studies in animals
J. Clin. Invest. 28, 943-952

HAHN, F.E. (1980):

New derivatives of chloramphenicol, active against
resistant bacteria

Naturwissenschaften 67, 89-90

HAHN, F.E., J.E. HAYES, C.L. WISSEMAN JR., H.E. HOPPS
und J.E. SMADEL (1956):

Mode of action of chloramphenicol

VI. Relation between structure and activity in the
chloramphenicol series

Antibiotics and Chemotherapy 6, 531-543

HAMANN, J., W. HEESCHEN und A. TOLLE (1980):

Untersuchungen über Nachweis, Isolierung und Identifi-
zierung von Antibiotika-Rückständen in der Milch
6. Die Hemmung der Laktatbildung als Meßkriterium
im Screening-Test zum Nachweis antibiotisch wirksamer
Substanzen

Milchwissenschaft 35, 544-546

HAMANN, J., A. TOLLE, A. BLÜTHGEN und W. HEESCHEN
(1975):

Untersuchungen über Nachweis, Isolierung und Identifi-
zierung von Antibiotikarückständen in der Milch
2. Mitteilung: Chloramphenicol

Milchwissenschaft 30, 68-75

HAMBURGER, R.N. (1966):

Chloramphenicol-specific antibody

Science 152, 203-205

HAPKE, H.J., J. ABEL, H. GHOSCH, S. TACHAMPA und

S. YOUSSEF (1977):

Chloramphenicol-Wirkungen auf Enzymsysteme innerhalb
des Arzneimittelabbaus

Zbl. Vet. Med. A 24, 701-714

HAPKE, H.J. (1979):

Klinische Störwirkungen des Chloramphenicol

Dtsch. tierärztl. Wschr. 86, 104-107

HAPKE, H.J. (1981):

Störwirkungen bei Tierarzneimitteln

Dtsch. tierärztl. Wschr. 88, 274-278

HEGNER, D. (1981):

Nutzen-Risiko-Abschätzung von Rückständen in Lebens-
mitteln

Prakt. Tierarzt 10, 813-822

HESS, G.B. (1950):

Polarographic estimation of chloramphenicol
(chloromycetin)

Anal. Chem. 22, 649-651

HOCK, C. und F. LIEMANN (1985):

Die Entwicklung eines Radioimmunoassays zum Nachweis
von Chloramphenicol und 3'-Chloramphenicol-Beta-D-
Monoglucuronid

Arch. Lebensmittelhyg. 36, 138-142

HOCK, C. und F. LIEMANN (1986):

Chloramphenicol: Entwicklung und exemplarische
Anwendung eines Radioimmunoassays

Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 40, 64-65

HOLLSTEIN, E., W. LAUE und G. ZAPF (1981):
Gaschromatographische Bestimmung von Chloramphenicol-
Rückständen in tierischem Material
Nahrung 25, 143-149

HOLTMANNSPÖTTER, H. und H.-P. THIER (1982):
Analysemmethode für Rückstände von sechs Sulfonamiden
und Chloramphenicol durch Gaschromatographie an
Glaskapillaren
Dtsch. Lebensm.-Rdsch. 78, 347-350

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION (1986):
Detection of inhibitors
E-Doc 244 Correction sheet

JANSSEN, G. und H. VANDERHAEGHE (1973):
Preparation of trimethylsilyl derivatives of
chloramphenicol for gas-liquid chromatography
J. Chromatogr. 82, 297-306

JANSSEN, G. und H. VANDERHAEGHE (1975):
Thin-layer chromatography of chloramphenicol and
thiamphenicol
J. Chromatogr. 114, 266-269

JOHANNES, B., K.-H. KÖRFER, J. SCHAD und I. ULBRICH
(1983):
Bestimmung von Chloramphenicol Rückständen in
eßbaren Geweben
Arch. Lebensmittelhyg. 34, 1-7

JOOS, S. und F. BAUM (1986):
Radioimmunologischer Nachweis von Chloramphenicol in
Eiern nach Verfütterung an Legehennen
Tierärztl. Umschau 41, 220-225

KAEMMERER, K. und M. KIETZMANN (1983):

Zur Bedeutung der sekundären Verfügbarkeit
Prakt. Tierarzt 10, 881-888

KARKOCHA, I. (1979):

Detection of chloramphenicol residues in eggs

Roczn. Paustw. Zakl. Hig. 30, 43-45

ref. in: Chem. Abstr. 1979, 91, 37562q

KATO, N., H. NARUSE, M. IRIE und A. TSUJI (1979):

Fluorophotometric enzyme immunoassay of thyroid-
stimulating hormone

Anal. Biochem. 96, 419-425

KEISER, G. und H.R. WALDER (1970):

Die idiopathische und die medikamentös bedingte
erworbene aplastische Anämie

Schweiz. med. Wschr. 100, 697-702

KIETZMANN, M. (1983):

Einführung in die Kinetik für die Praxis

Prakt. Tierarzt 64, 577-584

KIETZMANN, M. und M. KREISNER (1983):

Beitrag zur Pharmakokinetik von Chloramphenicol und
Tylosin in Kombinationspräparaten

2. Mitt.: Pharmakokinetische Interaktionen zwischen
Chloramphenicol und Tylosin bei Kälbern und Ratten

Zbl. Vet. Med A 30, 129-139

KNOTHE, H. und G.A. DETTE (1982):

Neben- und Wechselwirkungen wichtiger Antibiotika

Prakt. Tierarzt 63, 815-819

KÖHLER, E. (1982):

Mikrobiologisches Nachweisverfahren für Chloramphenicol im Harn (Screening-Test für Schlachttiere mit Hilfe des Enzyms β -Glucuronidase
Diss. med. vet., Hannover

KRAACK, J. und A. TOLLE (1969):

Zum Nachweis von Hemmstoffen in Milch mit dem Brillantschwarz-Reduktionstest
I. Teil: Verbesserte Methode
Arch. Lebensmittelhyg. 20, 145-149

KRISHNA, G., I. AYKAC und D. SIEGEL (1981):

Recent studies on the mechanism of chloramphenicol activation responsible for aplastic anemia.

In: NAJEAN, Y., G. TOGNONI und A.A. YUNIS (Eds.):
Safety problems related to chloramphenicol and thiamphenicol therapy, Raven, New York

KUNIN, C.M., A.J. GLAZKO und M. FINLAND (1959):

Persistence of antibiotics in blood of patients with acute renal failure. II. Chloramphenicol and its metabolic products in the blood of patients with severe renal disease or hepatic cirrhosis
J. Clin. Invest. 38, 1498-1508

KUTTER, R., D. JAHR und H. STRITZINGER (1982):

Nachweis und Bestimmung von Chloramphenicol mit HPLC und GC/MS
Fleischwirtsch. 62, 515-516

LACEY, R.W. (1984):

Does the use of chloramphenicol in animals jeopardise the treatment of human infections?
Vet. Rec. 114, 6-8

LANGNER, H.J., U. TEUFEL, M. SIEGERT, M. FROMMHOLD und
H. SEIDLER (1973):

Die Bestimmung von Antibiotikagemischen im Ultra-
Mikro-Maßstab mit Hilfe einer neuen "Kurzzeit-Nieder-
spannungselektrophorese"

Fleischwirtsch. 53, 557-559

LAUE, W., E. HOLLSTEIN und G. ZAPF (1980):

Bioverfügbarkeit von Chloramphenicol nach subkutaner
Applikation und Ausscheidung mit der Milch bei Kühen
Mh. Vet.-Med. 35, 344-346

van der LEE, J.J. (1981):

Determination of chloramphenicol and its application
of residues in milk and in dairy cows

Diss. Leiden, Holland

van der LEE, J.J., W.P. van BENNEKOM und H.J. de JONG
(1980):

Determination of chloramphenicol at ultra-trace levels
by high-performance differential pulse polarography
application to milk and meat

Anal. Chim. Acta 117, 171-182

LEVINE, J. und H. FISCHBACH (1951):

The chemical determination of chloramphenicol in
biological materials

Antibiotics and Chemotherapy 1, 59-62

LIETMAN, P.S, T.J. WHITE und W.V. SHAW (1976):

Chloramphenicol: an enzymeological microassay
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 10, 347-353

LIDL, R. (1983):

Nachweis von Chloramphenicol-Rückständen in Kuhmilch
mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie
Diss. med. vet., München

LIN, Y.T., K.T. WANG und T.I. YANG (1966):

Poliamide layer chromatography of chloramphenicol and
its derivatives
J. Chromatogr. 21, 158-159

LONG, L.M. und H.D. TROUTMAN (1949):

Chloramphenicol (chloromycetin)

VI. A synthetic approach

VII. Synthesis through p-nitroacetophenone

J. Am. Chem. Soc. 71, 2469-2475

LÖSCHER, W., O. DORNHEIM und F. MÜLLER (1985):

Chloramphenicol in der Muskulatur von Schlachttieren.
Rückstandsuntersuchungen mit einer hochempfindlichen
gaschromatographischen Methode
Arch. Lebensmittelhyg. 36, 101-124

LÜBKE, K. und B. NIEUWEBOER (1978):

Immunologische Tests für niedermolekulare Wirkstoffe
Thieme Verlag, Stuttgart

LUKASS, H. (1971):

Untersuchungen über die Auswirkung der Erhitzung anti-
biotischer Reinsubstanzen und Anabolika in Organ- und
Fleischproben normal geschlachteter Kälber auf die
biologische Aktivität im mikrobiologischen Hemmstoff-
test
Diss. med. vet., Hannover

MALISCH, R. (1987):

Multimethode zur Bestimmung der Rückstände von Chemotherapeutica, Antiparasitica und Wachstumsförderern in Lebensmittel tierischer Herkunft.

3. Mitteilung: Bestimmung von Chloramphenicol und Meticlorpindol

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 184, 467-477

MALISCH, R. und U. SANDMEYER (1984):

Multi-Methode zur Bestimmung zahlreicher Antibiotika und Antiparasitika in tierischen Lebensmitteln

Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 38, 73-74

MALISCH, R., U. SANDMEYER und K. KYPKE-HUTTER (1984):

Zur Bestimmung von Sulfonamiden, Nitrofuranen, Chloramphenicol und Trimethoprim in Lebensmittel tierischen Ursprungs

Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 38, 11-12

MANYAN, D.R., G.K. ARIMURA und A.A. YUNIS (1975):

Comparative metabolic effects of chloramphenicol analogues

Mol. Pharmacol. 11, 520-527

MÄRTLBAUER, E. und G. TERPLAN (1987):

Ein enzymimmunologischer Nachweis von Chloramphenicol in Milch

Arch. Lebensmittelhyg. 38, 3-7

MERCER, H.D., G.E. HEATH, P.E. LONG, D.H. SHOWALTER und T.E. POWERS (1978):

Drug residues in food animals. I. Plasma and tissue kinetics of chloramphenicol in young cross-bred swine
J. Vet. Pharmacol. Therap. 1, 19-36

MEYER, H.H.D. (1986):

Application of enzymimmunoassay (EIA) and HPLC-RIA
for the control of anabolic sex hormones in animal
produktion

Proceedings 2nd World Congress Foodborne Infections
and Intoxications, Berlin, Mai 1986

MEYER, V. (1980):

Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Verlag Diesterweg, Frankfurt a.M., Berlin, München

NAKAGAWA, T., M. MASADA und T. UNO (1975):

Gas chromatographic determination and gas chromato-
graphic-mass spectrometric analysis of chlorampheni-
col, thiamphenicol and their metabolites

J. Chromatogr. 111, 355-364

NEUMAN und MAUR (1981):

Antibiotika-Kompendium

Verlag Huber, Bern, Stuttgart, Wien

N.N., (1975):

Annotation: Thyphoid fever in Mexico

Lancet 1, 1230

N.N., (1980):

AMA Department of drugs

AMA Drug Evaluation, 4th Ed., Wiley & sons, New York
zit. nach SCHMID (1983)

N.N., (1983):

Chloramphenicol in Fleisch und Organen (DC, HPLC)
(Routine-Verfahren)

Bundesgesundhbl. 26 Sonderheft XIV-XVI

N.N., (1985):

Beckman Instruments: Operating manual; LS 1801, 3801
5801 Series, liquid scintillation systems

NOUWS, J.F.M., J. LAURENSEN und M.M.L. AERTS (1987a):
Monitoring of chloramphenicol residues in eggs by
HPLC and an immunoassay (Quik-card^R)

Arch. Lebensmittelhyg. 38, 7-9

NOUWS, J.F.M., F. REEK, M.M.L. AERTS, M. BAAKMAN und
J. LAURENSEN (1987b):

Monitoring slaughtered animals for chloramphenicol
by an immunoassay test kit (Quik-card^R)

Arch. Lebensmittelhyg. 38, 9-11

PETZ, M. (1983):

Rückstandsanalyse von Chloramphenicol und verschie-
denen Sulfonamiden in Eiern und Fleisch durch HPLC
Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 37, 43

PETZ, M. (1984a):

Rückstände im Ei nach Behandlung von Legehennen mit
Chloramphenicol und Furazolidon

Arch. Lebensmittelhyg. 35, 51-54

PETZ, M. (1984b):

Übergang von Chloramphenicol und Furazolidon in das
Hühnerei

Lebensmittelchem. Gerichtl. Chem. 38, 75

PETZOLD, K. (1977):

Kompodium der veterinärmedizinischen Mikrobiologie
Teil I: Allgemeine Mikrobiologie und Seuchenlehre
einschließlich der Immunologie

Verlag Schaper, Hannover

PFLEGEL, P. und I. SHOUKRALLAH (1973):

Zur gleichzeitigen polarographischen Bestimmung von
Chloramphenicol und Chloramphenicolpalmitat

Pharmazie 28, 483-484

PFLEGEL, P. und I. SHOUKRALLAH (1974):

Polarographie von Chloramphenicolpalmitat

Pharmazie 29, 316-320

PICKERING, L.K., J.L. HOECKER, W.G. KRAMER, J.G.

LIEHR und R.M. CAPRIOLI (1979):

Assay for chloramphenicol compared: Radioenzymatic,
gas chromatographic with electron capture, and gas
chromatographic-mass spectrometric

Clin. Chem. 25, 300-305

PIETTA, P. (1979):

Simplified thin-layer chromatographic method for the
simultaneous determination of chloramphenicol and
1-(4'-nitrophenyl)-2-aminopropane-1,3-diol

J. Chromatogr. 177, 177-179

PIETTA, P.G., D. AGNELLINI und M. PACE (1979):

Colorimetric determination of 1-(4'-nitrophenyl)-2-
aminopropane-1,3-diol with 2,4,6-trinitrobenzene-
sulfonic acid in the presence of chloramphenicol

J. Pharm. Sci. 68, 1565-1566

PILLOUD, M. (1973):

Pharmacokinetics, plasma protein binding and dosage of
chloramphenicol in cattle and horses

Res. Vet. Sci. 15, 231-238

PILLOUD, M. (1982):

Antibiotiques et chimiothérapiques - De la recherche à la pratique

I. Quelques remarques destinées aux praticiens sur les particularités du chloramphénicol et du thiamphénicol
Schweiz. Arch. Tierheilk. 124, 121-131

PLATE, C. (1983):

Nachweis von Chloramphenicol im Serum und eßbaren Geweben von Puten mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie unter Einsatz von β -Glucuronidase
Diss. med. vet., Hannover

RAO, V.R. und R. CLARENBURG (1977):

Pharmacokinetics of intravenously injected chloramphenicol in baby pigs
Drug Metabolism and Disposition 5, 253-258

RATTENBERGER, E., H. DANGSCHAT, C. SCHWARZER und K. BAUER (1986):

Untersuchungen zum Rückstandsverhalten von Chloramphenicol bei Forellen mit Hilfe des Radioimmunotests
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 99, 243-246

REBSTOCK M.C., H.M. CROOKS, J. CONTROULIS und Q.R. BARTZ (1949):

Chloramphenicol (chloromycetin). IV. Chemical studies
J. Am. Chem. Soc. 71, 2458-2462

ROBINSON, L.R., R. SELIGSOHN und S.A. LERNER (1978):
Simplified radioenzymatic assay for chloramphenicol
Antimicrobial Agents and Chemotherapy 13, 25-29

ROLLE, M. und A. MAYR (1978):

Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 4. Aufl.
Enke Verlag, Stuttgart

de RUIG, W.G. und H. HOOIJERINK (1985):

Determination of chloramphenicol in milk by HPLC with
elektrochemical detection

Neth. Milk Dairy J. 39, 155-163

RÜSSEL, H.A. (1978):

Über die Bestimmung von Chloramphenicol in tierischen
Gewebe durch HPLC

Chromatographia 11, 341-343

SCHERK, F. und O. AGTHE (1986):

Rückstandsuntersuchungen von Hühnereiern auf Chlor-
amphenicol mittels Radioimmunoassay

Arch. Lebensmittelhyg. 37, 146-147

SCHMID, A. (1983):

Chloramphenicolrückstände in Lebensmitteln tierischer
Herkunft als potentielle Ursache der aplastischen
Anämie des Menschen

Dtsch. tierärztl. Wschr. 90, 201-208

SCHMIDT, T., W. TOMBERG und H. BÜNING-PFAUE (1985):

Nachweis von Chloramphenicol mittels elektro-
chemischer Detektion

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 180, 53-54

SCHMIDT, U. (1975):

Rückstände in Schlachttierkörpern von Schweinen
nach therapeutischer Verabreichung von Chloramphenicol

Tierärztl. Prax. 3, 37-40

SCHULZE, K. (1986):

Problematik von Arzneimittelrückständen in Lebens-
mitteln tierischer Herkunft

RFL 38, 133-134

- SCHUURS, A.H.W.M. und B.K. van WEEMEN (1980):
Enzyme-immunoassay: A powerful analytical tool
J. Immunoassay 1, 229-249
- SCHWARTZ, D.P. und F.E. McDONOUGH (1984):
Practical screening procedure for chloramphenicol in
milk at low parts per billion level
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 67, 563-565
- SCHWARZER, C.W. (1985):
Radioimmunologischer Nachweis von Chloramphenicol in
der Geflügelproduktion
Diss. med. vet., München
- SCHWARZER, C., W. GEDEK und W. HOLLWICH (1986):
Chloramphenicol-Spiegelverlauf im Eutersekret von
Kühen nach intramammärer Verabreichung von Tardo-
myocel-L-Suspension beim Trockenstellen
Vet.-Med. Nachr. 1, 50-54
- SEEFELD, F. und M. DUNSING (1976):
Gaschromatographische Bestimmung von Chloramphenicol-
Rückständen
Mh. Vet.-Med. 31, 703-707
- SHALIT, I. und M.I. MARKS (1984):
Chloramphenicol in the 1980s
Drugs 28, 281-291
- SHIH, I.K. (1971a):
Degradation products of chloramphenicol
J. Pharm. Sci. 60, 786-787

SHIH, I.K. (1971b):

Photodegradation products of chloramphenicol in aqueous solution

J. Pharm. Sci. 60, 1889-1890

SINGER, C.J. und S.E. KATZ (1985):

Microbiological assay for chloramphenicol residues

J. Assoc. Off. Anal. Chem. 68, 1037-1041

SISODIA, C.S., R.H. DUNLOP, V.S. GUPTA und L. TAKSAS (1973):

A pharmacologic study of chloramphenicol in cattle

Am. J. Vet. Res. 34, 1147-1151

SKRANDIES, G. und K. HAUSMANN (1972):

Knochenmarkschäden nach Chloramphenicolbehandlung in Hamburg und Umgebung

Med. Klin. 67, 569-577

SMADEL, J.E. und E.B. JACKSON (1947):

Chloromycetin, an antibiotic with chemotherapeutic activity in experimental rickettsial and viral infections

Science 106, 418-419

SMITH, A.L. und D.H. SMITH (1978):

Improved enzymatic assay of chloramphenicol

Clin. Chem. 24, 1452-1457

SUMMA, A.F. (1965):

Polarographic determination of chloramphenicol preparations

J. Pharm. Sci. 54, 442-444

TAKESHITA, R. und T. YAMASHITA; (1972):

Detection of chloramphenicol in food by thin-layer-chromatography

J. Hygienic Chemistry (Eiseikagaku/Japan) 18, 56-60
zit. nach BOERTZ (1984)

TERPLAN, G. und K.-J. ZAADHOF (1967):

Zum Vorkommen und Nachweis von Hemmstoffen in der
Milch - eine kurze Übersicht
Milchwissenschaft 22, 761-770

THEODORIDES, V.J., C.J. DiCUOLLO, J.R. GUARINI und
J.F. PAGANO (1968):

Serum concentrations of chloramphenicol after intra-
ruminial and intra-abomasal administration in sheep
Am. J. Vet. Res. 29, 643-645

TROLLDENIER, H. (1977):

Antibiotika in der Veterinärmedizin
Verlag Fischer, Jena

van UHLEN, F.W. (1976):

Veterinair Gebruik van Chlooramphenicol
Tijdschr. Diergeneesk. 101, 679-680

UNTERMAN, H.W. und S. WEISSBUCH (1974):

Elektrochemische Bestimmungsmethoden von Antibiotika
Pharmazie 29, 752-756

VAJDA, G. und G. BEKESSY (1981):

Acute chloramphenicol poisoning (the so-called "grey
syndrome") in piglets

Magyar Allatorvosok Lapja 36, 765-767

ref. in: Veterinary Bulletin 1982, 52/5, 2633

VAZQUEZ, D. (1964):

Uptake and binding of chloramphenicol by sensitive
and resistant organisms
Nature 203, 257-258

WAL, J.M., J.C. PELERAN und G. BORIES (1979):

Electron-capture detection of chloramphenicol using
a heptafluorbutyrate derivate
J. Chromatogr. 168, 179-185

WAL, J.M., J.C. PELERAN und G.F. BORIES (1980):

High performance liquid chromatographic determination
of chloramphenicol in milk
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 63, 1044-1048

WALLERSTEIN, R.O., P.K. CONDIT, C.K. KASPER, J.W.

BROWN und F.R. MORRISON (1969):

Statewide study of chloramphenicol therapy and fatal
aplastic anemia
J. Am. Med. Assoc. 208, 2045-2050

WALTER, A.M. und L. HEILMEYER (1975):

Antibiotika-Fibel, 4. Aufl.
Thieme Verlag, Stuttgart

WATSON, A.D.J. (1980):

Further observations on chloramphenicol toxicosis in
cats
Am. J. Vet. Res. 41, 293-294

WATSON, A.D.J. und P.J. McDONALD (1976):

Distribution of chloramphenicol in some tissues and
extravascular fluids of dogs after oral administration
Am. J. Vet. Res. 37, 557-559

WATSON, A.D.J. und D.J. MIDDLETON (1978):

Chloramphenicol toxicosis in cats

Am. J. Vet. Res. 39, 1199-1203

WEISS, P.J., M.L. ANDREW und W.W. WRIGHT (1957):

Solubility of antibiotics in twenty-four solvents:

Use in analysis

Antibiotics and Chemotherapy 7, 374-377

WILLIAMS, B.L. und K. WILSON (1978):

Praktische Biochemie: Grundlagen und Techniken

Thieme Verlag, Stuttgart

YUNIS, A.A. (1981):

Chloramphenicol toxicity and the role of the p-NO₂ in
aplastic anemia

In: NAJEAN, Y., G. TOGNONI und A.A. YUNIS (Eds.):

Safety problems related to chloramphenicol and
thiamphenicol therapy, Raven, New York

Gesetze und Verordnungen

Gesetz Über den Verkehr mit Lebensmitteln, Tabakerzeugnissen, kosmetischen Mitteln und sonstigen Bedarfsgegenständen (Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz) vom 15. August 1974

Lebensmittelrecht, Textsammlung I, Stand 1. Aug. 1986
Verlag Beck, München

Dritte Verordnung zur Änderung der Verordnung über Stoffe mit pharmakologischer Wirkung vom 5. April 1984
Bundesgesetzblatt, Jahrgang 1984, Teil I, 597-598

Fleischhygienegesetz (FlHG) vom 13. April 1986 mit den Ausführungsbestimmungen A über die Untersuchung und gesundheitspolizeiliche Behandlung der Schlachttiere und des Fleisches bei Schlachttieren im Inland
Lebensmittelrecht, Textsammlung I, Stand 1. Aug. 1986
Verlag Beck, München

Verordnung über die hygienischen Anforderungen und amtlichen Untersuchungen beim Verkehr mit Fleisch (Fleischhygiene-Verordnung - FlHV) vom 30. Okt. 1986
Bundesgesetzblatt, Jahrgang 1986, Teil I, 1678-1722

Allgemeine Verwaltungsvorschrift über die Durchführung der amtlichen Untersuchungen nach dem Fleischhygienegesetz (VwVFlHG) vom 11. Dezember 1986
Bundesanzeiger 38 (1986), Nummer 238a

Ein Teil der Untersuchungen (RIA) wurde im Rahmen eines durch das Bundesgesundheitsamt geförderten Forschungsvorhabens durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. G. Terplan, der die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte und stets unterstützte, bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben, insbesondere Herrn Dr. K.- H. Jaschke, Herrn E. Märtlbauer und Frl. I. Erlmeier möchte ich an dieser Stelle ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. J. Meyer möchte ich für die Ermöglichung der Versuche am Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. P. Dorn, Leiter des Zentralinstitutes des Tiergesundheitsdienstes Bayern in Grub für die Planung und Organisation des in Kitzingen durchgeführten Fütterungsversuchs und Herrn Dr. C. Schwarzer für wertvolle Tips und Anregungen in "RIA-Fragen".

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Manz vom Landesamt für das Gesundheitswesen Nordbayern in Erlangen und Herrn Dr. H. W. Krutsch vom Städtischen Schlachthof Nürnberg für die Überlassung CAP-haltiger Fleischproben.

LEBENS LAUF

Name: Michael Beck

Geburtsdatum: 18. Juni 1959

Geburtsort: Wurmannsquick / Bayern

Eltern: Katharina und Ludwig Beck

Grundschule: Sept. 1965 - Juli 1969 Volksschule
Wurmannsquick

Gymnasium: Sept. 1969 - Juni 1978 Karl-von-Closen-
Gymnasium Eggenfelden-Gern

Abitur: Juni 1978

Grundwehrdienst: Juli 1978 - Sept. 1979 in Bad Reichenhall

Studium: Wintersem. 1979/80 - Wintersem. 1984/85
Ludwig-Maximilians Universität in München
Fachbereich Tiermedizin

Examen: München, März 1985

Approbation: München, April 1985

Berufliche
Tätigkeit: Okt. 1985 - Dez. 1986 Wissenschaftlicher
Mitarbeiter am Lehrstuhl für Hygiene und
Technologie der Milch, LMU München
seit Jan. 1987 freier Mitarbeiter und An-
fertigung der Dissertation

